

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II**



**CAPTACIÓN DE SUBUNIDADES G[alfa] POR  
CÉLULAS DEL SNC. ANÁLISIS DEL MECANISMO  
DE INTERNALIZACIÓN Y ESTUDIO DE SU  
ACTIVIDAD FUNCIONAL**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

Isabel de Antonio García

Bajo la dirección de la doctora

Pilar Sánchez-Blázquez

**Madrid, 2001**

**ISBN: 84-669-2004-8**

## INDICE

### I. *Introducción*

<b>1. Proteínas G</b>	3
1.1. Desarrollo histórico	5
1.2. Ciclo de activación	8
1.3. Subunidades que integran los heterotrímeros	11
1.3.1. Subunidad $\alpha$	11
1.3.1.1 Estructura de la subunidad $\alpha$	15
1.3.2. Subunidades $\beta\gamma$	18
1.3.2.1 Estructura del dímero $\beta\gamma$	20
1.3.3. Interacciones $G\alpha$ - $G\beta\gamma$	22
1.3.4. Interacciones con efectores	24
1.3.4.1 Interacciones $G\alpha$ -efectores	25
1.3.4.2 Interacciones $G\beta\gamma$ -efectores	27
<b>2. Receptores acoplados a proteínas G</b>	29
2.1. Interacciones receptor-proteínas G	32
<b>3. Moduladores de la función de proteínas G</b>	34
3.1. Interacción RGS-proteínas G	34
3.2. Interacción fosducina-proteínas G	36
<b>4. Localización de las proteínas G en la bicapa lipídica</b>	37
4.1. Estructura de las caveolas	40
4.2. Interacción caveolina-proteínas G heterotriméricas	41
<b>5. Planteamientos y objetivos del trabajo</b>	42

### II. *Materiales y Métodos*

<b>1. Materiales</b>	
1.1. Animales	49
1.2. Cultivos celulares	49
1.2.1. Cultivos de astrocitos	49
1.2.2. Cultivos de neuronas	50
1.3. Anticuerpos empleados en este estudio	51
1.4. Proteínas $G\alpha$ -miristoiladas y anticuerpos frente a proteínas G	52
1.4.1. Purificación de IgGs a partir de sueros inmunes	53
1.5. Estudios de inmunodetección	53
1.5.1. Preparación de astrocitos para SDS/PAGE	54
1.5.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida	54
1.5.3. Inmunotransferencia (Western-blotting)	55
1.6. Marcaje con fluorescencia de proteínas recombinantes	
$G\alpha i2$ -miristoiladas e IgGs	57
1.7. Acoplamiento de proteínas recombinantes $G\alpha i2$ -miristoiladas	

e IgGs a oro coloidal	57
1.7.1. Determinación de la cantidad estabilizadora requerida en el marcaje con oro coloidal	58
1.7.2. Preparación del conjugado oro coloidal/proteína	59
1.8. Oligodeoxinucleótidos antisentido: Diseño y síntesis.	59
<b>2. Métodos</b>	
2.1. Microscopía de fluorescencia	61
2.2. Microscopía confocal	
2.2.1. Fundamentos de la microscopía confocal	62
2.2.2. Procesamiento de muestras para microscopía confocal	63
2.3. Procesamiento de muestras para microscopía electrónica	63
2.3.1. Características del proceso de fijación	64
2.3.2. Perfusión vascular	65
* Tinción de Nissl	66
2.3.3. Inclusión	67
2.3.4. Obtención de cortes ultrafinos en el ultramicrotomo	68
2.3.5. Tinción de rejillas	69
<b>3. Estudios de actividad biológica</b>	
3.1. Administración i.c.v.	70
3.1.1. Administración de PTX	70
3.1.2. Administración de oligodeoxinucleótidos antisentido	71
3.2. Valoración del efecto analgésico evocado por opioides	72
<b>4. Estudios sobre cultivos celulares</b>	73
4.1. Ensayos de inmunofluorescencia	74
4.1.1. Cambios en el patrón de internalización de $G\alpha_{i2}$ -exógena tras modificar los procesos de endocitosis	75
4.1.2. Inhibición de PKC/PKA	76
4.2. Administración de ODNs a cultivos de astrocitos	76
4.3. Inmunocitoquímica. Tratamiento con anticuerpos	77
4.4. Estimación de la proliferación celular	77
4.4.1. Ensayos con yoduro de propidio	79
4.4.2. Incorporación de timidina tritiada	80
<b>5. Análisis estadístico</b>	81
 <b>III. Resultados</b>	
<b>1. Estudios estructurales</b>	85
1.1. Detección de zonas específicas de unión IgGs	
anti- $G\alpha_{i2}$ /proteína $G\alpha_{i2}$ -endógena	85
1.2. Resultados de la administración <i>in vivo</i> de proteínas recombinantes	
$G\alpha_{i2}$ -miristoiladas	88
1.2.1. Cambios en el patrón de internalización de IgGs anti- $G\alpha_{i2}$	

Inducido por el tratamiento con agonistas o con PTX	90
<b>2. Microscopía confocal</b>	92
2.1. Resultados obtenidos tras el tratamiento con IgGs anti-G $\alpha$ i2 analizados mediante microscopía confocal	97
2.2. Análisis confocal de la internalización e incorporación a la cascada de señales de proteínas G $\alpha$ i2-miristoiladas exógenas	102
2.3. Análisis cuantitativo de los histogramas	107
<b>3. Estudios ultraestructurales: Microscopía electrónica</b>	
3.1. Entrada y localización de la proteína G $\alpha$ i2-miristoilada	112
3.2. Caracterización del mecanismo de entrada de las proteínas G $\alpha$ i2-miristoiladas al interior celular	116
<b>4. Estudios comportamentales</b>	
4.1. Efectos de la administración <i>in vivo</i> de subunidades G $\alpha$ -miristoiladas en la antinocicepción supraespinal evocada por opioides	123
4.2. Administración de subunidades G $\alpha$ i2-exógenas en animales <i>knock-down</i>	125
4.2.1. Efectos sobre animales pretratados con ODN-G $\alpha$ i2125	
4.2.2. Efectos de la administración de subunidades G $\alpha$ i-exógenas en animales tratados con PTX	128
4.2.3. Efectos sobre animales pretratados con ODN- $\mu$	130
<b>5. Cultivos celulares</b>	133
5.1. Caracterización de las subunidades $\alpha$ de las proteínas G presentes en astrocitos de rata	133
5.2. Captación por astrocitos de IgGs anti-G $\alpha$	134
5.3. Internalización de G $\alpha$ i2-miristoiladas exógenas	136
5.4. Caracterización de la entrada de G $\alpha$ i2-miristoiladas	
5.4.1. Implicación de las caveolas	141
5.4.2. Papel de endocitosis dependiente de PKC en la internalización de G $\alpha$ -miristoiladas	147
<b>6. Traslocación de G<math>\alpha</math>i2-miristoiladas al núcleo: Estudios de proliferación celular y síntesis de DNA</b>	149
6.1. Estudios de proliferación celular	149
6.2. Síntesis de DNA	154
6.2.1. Inducción de síntesis de DNA mediada por suero	154
6.2.2. Resultados de la administración de toxina pertúsica y anticuerpos específicos anti-G $\alpha$ i2	156
6.2.3. Inducción de síntesis de DNA mediada por la administración exógena de G $\alpha$ i2-miristoilada	158



6.2.4.1. Bloqueo funcional tras la administración de anticuerpos específicos anti-caveolina	165
6.2.4.2. Bloqueo por alteración de lípidos de membrana	167
<b>7. Estudios funcionales</b>	
7.1. Incorporación de Gαi2-exógena a la cascada de señalización	171
 <b>IV. Discusión</b>	 193
 <b>V. Bibliografía</b>	 223

## ABREVIATURAS MAS UTILIZADAS

**AC:** Adenilato Ciclasa  
**ADN:** Ácido desoxirribonucleico  
**ADP:** Difosfato de adenosina  
**AMPc:** Monofosfato de adenosina cíclico  
**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero  
**ATP:** Trifosfato de adenosina  
**BME:** Basal Medium (Eagle)  
**BME/F-1S:** Basal Medium+ 1% suero fetal de ternera  
**BME/F-10S:** Basal Medium+10% suero fetal de ternera  
**BSA:** Albúmina sérica bovina  
**β-FNA:** β-funaltrexina  
**CTX:** Toxina colérica  
**DPDPE:** [D-Pen2,5]encefalina  
**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético  
**E.S.M:** Error estándar de la media  
**FCS:** suero fetal de ternera  
**GDP:** Difosfato de guanosina  
**GFAP:** proteína glial fibrilar ácida  
**GMPc:** Monofosfato de guanosina cíclico  
**GTP:**Trifosfato de guanosina  
**GTPγS:** Guanosín 5-O-(3-tiotrifosfato)  
**H7:** [1-(5-isoquinolinil-sulfonil),2-metil] piperazina  
**i.c.v.:** intracerebroventricular  
**IgGs:** Inmunoglobulina G  
**IP:** Ioduro de propidio  
**MEP:** Máximo efecto posible  
**ODN:** Oligodeoxinucleótido antisentido  
**SGPA:** Sustancia gris periacueductal  
**PB:** Tampón fosfato  
**PBS:** Tampón fosfato salino  
**PKA:** Proteína quinasa A  
**PKC:** Proteína quinasa C  
**PLA2:** Fosfolipasa A2  
**PTX:** Toxina pertúsica  
**SDS:** Dodecil sulfato sódico  
**SDS/PAGE:** Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS  
**SNC:** Sistema nervioso central  
**TBS:** Tampón TRIS-salino  
**TRIS:** tris(hidroximetil)aminometano  
**7TM :** Receptores acoplados a proteínas G, que poseen 7 dominios transmembranales

Una gran parte de las respuestas celulares que se observan tras la unión de un agonista a su receptor están mediadas por la activación de proteínas de membrana capaces de unir nucleótidos de guanina: **Proteínas G**. Las proteínas transductoras o proteínas G son una familia de heterotrómeros ( $\alpha\beta\gamma$ ) que, tras ser activados por el receptor, se disocian en  $\alpha$ -GTP más dímeros  $\beta\gamma$ . Ambas subunidades son capaces de regular la actividad de diversos efectores, produciendo cambios en la fisiología celular en respuesta a la información recibida. La importancia de las proteínas G en la correcta integración funcional de las células ha quedado confirmada en estudios con animales mutantes carentes de los genes que codifican los diferentes subtipos de proteínas  $G\alpha$ . Estos animales, denominados *Knock-out* según la terminología inglesa, evidencian alteraciones funcionales, morfológicas, tisulares e incluso alta incidencia de ciertas neoplasias.

En la actualidad hemos de considerar que, además del papel esencial de las proteínas G en la clásica cascada de señales que se inicia en los receptores de membrana, estas proteínas también desempeñan funciones altamente especializadas en orgánulos subcelulares (retículo endoplásmico, endosomas, aparato de Golgi, etc.) y contribuyen a regular el tráfico vesicular en la endocitosis y la exocitosis. Asimismo se ha propuesto que, al igual que otras moléculas de señalización, las proteínas G actúan como mensajeros neurotróficos siendo transportadas desde los terminales sinápticos hacia el cuerpo neuronal. En este sentido, sabemos que algunas de las subunidades  $\alpha$  de las proteínas transductoras G ( $G\alpha_i$  y  $G\alpha_z$ ), en determinadas circunstancias, p. ej. al ser estimuladas por factores neurotróficos, pueden abandonar la membrana y ser transportadas retrogradamente desde los terminales al cuerpo neuronal. De esta forma las señales que inciden en el extremo del axón alcanzarían el núcleo donde actuarían como un mensajero, participando en el control del desarrollo neural en el embrión así como en el mantenimiento de la integridad en el adulto. Hemos de destacar el hecho que estos dos subtipos de proteínas G poseen distintas propiedades (sensibilidad a toxinas) y presentan una distribución diferencial lo cual puede tener una enorme importancia fisiológica.

*En este punto, hemos de recordar que se han descrito una serie de patologías que cursan con alteraciones en el número y/o estado funcional de las proteínas G.*

*En los últimos cinco años se ha producido un avance espectacular en el conocimiento de la estructura molecular de las proteínas G, así mismo se han identificado un número considerable de moléculas capaces de interactuar con ellas y regular, de forma aún por definir, la duración y/o la magnitud de la respuesta mediada por la activación de las proteínas G. Por otra parte, se ha logrado determinar su estructura genética así como la localización de cada gen en los cromosomas. En base al conocimiento actual queda por redefinir el papel funcional de las proteínas G, que sin duda se presenta mucho mas complejo e importante del inicialmente asignado.*

*El trabajo realizado, en el Laboratorio de Neurofarmacología del Instituto Cajal, y que se presenta en esta Memoria de Tesis Doctoral, pretende contribuir al conocimiento del papel de las proteínas G como moléculas de señalización. Los resultados de la investigación demuestran que las subunidades  $G\alpha$  miristoiladas, administradas por vía intracerebroventricular en el ratón, pueden progresar desde el espacio periventricular siendo captadas por las células nerviosas y, lo que es aún mas importante, lograr su integración funcional en las vías de señalización asociada a los receptores G. Este hallazgo nos lleva a pensar en la existencia de una ruta fisiológica para la internalización de las proteínas G o al menos de sus subunidades  $G\alpha$ , lo que conllevaría un papel como mensajeros no solo intercelulares sino también **intracelulares**. Por tanto, este trabajo al tiempo amplía el conocimiento actual de la importancia las proteínas G en la comunicación neural, apunta la posibilidad que las propias proteínas G puedan ser utilizadas como agentes terapéuticos en aquellas patologías que implican un deterioro de la transducción receptoral.*

## **1. Proteínas G**

La superfamilia de las GTPasas comprende proteínas que unen GTP y lo hidrolizan a GDP. Dentro de ella están las llamadas proteínas G de bajo peso molecular que suelen ser polipéptidos de pocos aminoácidos (unos 200 aminoácidos), de las cuales existen evidencias de que están implicadas en la secreción regulada en células secretoras, transporte de vesículas axonales en células neuronales y tráfico polarizado en células epiteliales, y las proteínas G de alto peso molecular, que tienen una estructura heterotrimérica y cuya principal función es ayudar a los receptores de membrana para que internalicen sus señales mediante la regulación de mensajeros intracelulares. En este último y más importante grupo centraremos nuestro estudio.

Existen múltiples tipos de proteínas G de bajo peso molecular que unen GTP, entre ellas está el factor de elongación EF-Tu, que controla la elongación de péptidos en *Escherichia coli*. Esta proteína controla la translocación unidireccional de un sustrato (ARNt aminoacilado) a una localización específica (el ribosoma). Los oncogenes ras codifican una clase de proteínas reguladoras ligantes de GTP involucradas en el control de la proliferación celular. Estas son las proteínas Ras (H-Ras, Ki-Ras y N-Ras) expresadas en la casi totalidad de los tipos celulares de mamíferos. Existen también proteínas con una homología de secuencia aminoacídica con las proteínas Ras relativamente elevada (50-60%). Estas proteínas son principalmente: Ral (A y B), Rap1 (A y B), Rap2, R-Ras y TC21. En la actualidad la función de muchas de estas proteínas está aún por determinar.

Otro grupo de proteínas relacionadas con las proteínas Ras son la familia Rho (A, B y C), las proteínas Rac (1 y 2) y la proteína TC10, las cuales presentan un 30% de homología con las proteínas Ras. También con el mismo porcentaje de homología aparece la familia de las proteínas Rab. A excepción de Rab3, que se expresa sólo en tejidos neurales, las proteínas Rab de mamíferos son ubicuas. Se ha propuesto que estas proteínas participan de forma activa en el tráfico intracelular de vesículas (Hall, 1990).

Las proteínas G heterotriméricas están formadas por la combinación de una subunidad  $\alpha$  que une e hidroliza GTP, y por un dímero  $\beta\gamma$  que sólo se disocia por desnaturalización (Hamm, 1996; Neer, 1995). En la actualidad, se han identificado 21 subunidades  $\alpha$  diferentes, 5 subunidades  $\beta$  y 12 subunidades  $\gamma$  (Clapham, 1996; Hamm, 1996). De esto se podría deducir la existencia de muchas combinaciones de heterotrímeros, sin embargo, parecen existir una serie de combinaciones preferidas limitándose así el número de posibles formaciones (Kleus y col., 1992; Kleus y col., 1993; Ho y col., 1999; Robillard y col., 2000).

Las proteínas G participan en sofisticadas redes de señalización debido a que un único receptor puede estar acoplado a diferentes vías de generación de segundos mensajeros y/o a la regulación de distintos canales iónicos. Además, varios receptores pueden activar a un único efector (Simon, 1991). Por tanto, parece existir una comunicación entre distintas proteínas G, lo cual permite un mayor grado de refinamiento de la integración de señales. Según esto, la activación cruzada podría ser una parte esencial en el circuito de transducción de la información. Por otro lado, partes del sistema intracelular pueden ser construidas para proteger contra

esta activación cruzada. Por ejemplo, se ha encontrado que en células polarizadas del epitelio renal,  $G\alpha_{i2}$  está localizada en la membrana basolateral de la célula, mientras que  $G\alpha_{i3}$  está localizada en el Aparato de Golgi y en las membranas apicales. Por confinamiento de las proteínas G, e incluso de sus efectores en regiones localizadas de la célula, su posibilidad de interaccionar o de establecer activación cruzada puede ser disminuida de forma importante (Simon, 1991).

### **1.1 Desarrollo histórico**

El estudio de los mecanismos implicados en la transmisión de señales entre las células se inició a finales de los años 50. Rall y Sutherland (1956) observaron que la hormona adrenalina estimulaba las células del hígado para que éstas liberaran glucosa. Los análisis de fragmentos de células revelaron que la adrenalina provocaba que una enzima en la membrana plasmática convirtiera el ATP en otra sustancia hasta ese momento desconocida, el AMPcíclico. Este proceso era realizado por una enzima también desconocida hasta entonces: la adenilato ciclasa (AC). Sutherland sospechaba que la AC y el receptor eran la misma molécula. Sin embargo, estudios realizados posteriormente demostraron que eran entidades separadas.

Dos hechos condujeron a la demostración de que los nucleótidos de guanina participaban en la transmisión de la señal de adrenalina. Uno fue el estudio realizado por Rodbell y col. (1971) indicando que la presencia de la hormona glucagón y su receptor no eran suficientes para activar la AC, sino que el GTP tenía que estar presente también. El otro, que Cassel y Selinger (1976) descubrieran que

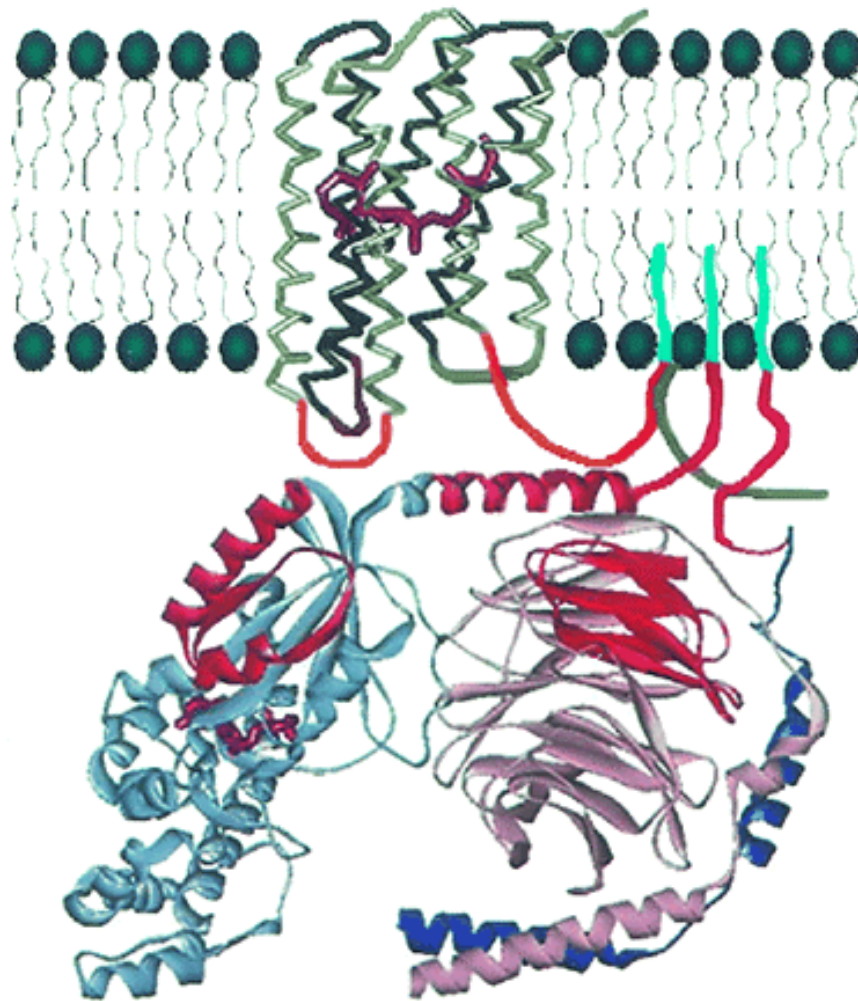
cuando la adrenalina se añadía a fragmentos de membrana plasmática, no sólo estimulaba la AC, sino que causaba la transformación del GTP a GDP, mediante una GTPasa que hidrolizaba el GTP liberando uno de sus grupos fosfato.

En 1977 Ross y Gilman diseñaron un experimento con el fin de inducir actividad AC en una línea de células mutantes que carecían de esta enzima. Esta línea fue descrita en 1975 y hoy en día se denomina *cyc<sup>-</sup>*. Ross quería insertar AC en las membranas utilizando un extracto de proteínas de membranas que contuviera esta enzima. Tal y como él esperaba, al exponer las membranas *cyc<sup>-</sup>* así tratadas a adrenalina, apareció AMPc. Sorprendentemente, en la situación control con el extracto inactivado, las membranas *cyc<sup>-</sup>* sintetizaban AMPc como si hubieran captado una AC activa del extracto. La explicación a este hecho llegó pronto, las células *cyc<sup>-</sup>* contenían AC, pero no se había detectado porque era inactiva. Esta inactividad se debía a la ausencia de otro componente celular que activaba a la AC. Ross y Gilman demostraron rápidamente que la sustancia activante era una proteína, que a su vez era activada por GTP, a la cual denominaron proteína G. Dedujeron que la adrenalina, por tanto, conducía a la producción del AMPc al pasar información a través de su receptor a una proteína G, la cual, cuando se le unía GTP, era capaz de estimular a la AC para producir AMPc.

En 1980 Sternweis y Northup purificaron la proteína G que se denominó  $G_s$ , ya que estimulaba (Astimulus@) la AC. Posteriormente, cuando se aislaron el receptor y la AC, se prepararon membranas artificiales que contenían receptor, proteína G y AC embebidos en fosfolípidos. De esta forma, a mediados de los 80 se habían identificado todos los elementos esenciales de la ruta que iba desde la adrenalina a la producción del segundo mensajero, AMPc. Simultáneamente a la



caracterización de la  $G_s$ , otros investigadores realizaron un descubrimiento similar estudiando cómo los bastones de la retina responden a la luz. Los experimentos de Bitensky y col. (1981) y Stryer y col. (1981) revelaron la existencia de otra proteína G que hoy en día se conoce como transducina o proteína  $G_t$ .



**Figura 1.** Representación espacial de las proteínas G unidas al receptor; la subunidad  $\alpha$  situada a la izquierda, está reflejada en color azul claro y el dímero  $\beta\gamma$  ( $\beta$ , rosado y  $\gamma$

**azul oscuro) a la derecha.** Tomado de Lambricght y col., 1994

Casi al mismo tiempo se descubrió la proteína  $G_i$ , Gilman y colaboradores (1982) vieron que @inhibía@ a la AC. Esto se observó mediante reconstitución de proteínas de hígado de conejo en plaquetas y membranas de células S49. En 1984 Sternweis y su grupo detectaron una proteína G distinta de la  $G_i$ , abundantemente distribuida en cerebro y sustrato de la toxina pertúsica (PTX). Esta proteína se denominó  $G_o$  (Aotra@ proteína G) y se presentaron evidencias de que no era un producto de proteólisis de la proteína  $G_i$ . Simultáneamente, el grupo de Neer detectó también este nuevo tipo de proteína G (Nerr y col., 1996). En los últimos años, mediante la aplicación de técnicas de clonaje se han podido detectar hasta 20 subtipos de proteínas transductoras G (Clapham, 1996; Hamm, 1996).

## **1.2 Ciclo de activación**

Independientemente del tipo de proteína G que transmite la señal, todas ellas tienen en común un ciclo funcional en la membrana plasmática, como se muestra en la figura 2. En ausencia de señales, que estimulen un receptor, la subunidad  $\alpha$  unida a  $\beta\gamma$  tiene una molécula de GDP. Cuando un ligando se une y activa al receptor se produce un cambio conformacional en el tercer dominio citosólico, lo que origina la salida de GDP y posibilita la entrada de GTP en la subunidad  $\alpha$  de la proteína G.

Este intercambio hace que la proteína G se separe del receptor y, que a su vez, la subunidad  $\alpha$  con el GTP unido se disocie del dímero constituido por las subunidades  $\beta\gamma$ . Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta\gamma$  pueden ahora actuar sobre el sistema efector específico, que puede ser enzimas como la adenilato ciclasa, la fosfolipasa C, fosfolipasa  $A_2$ , la fosfodiesterasa de los fotoreceptores demostrándose además

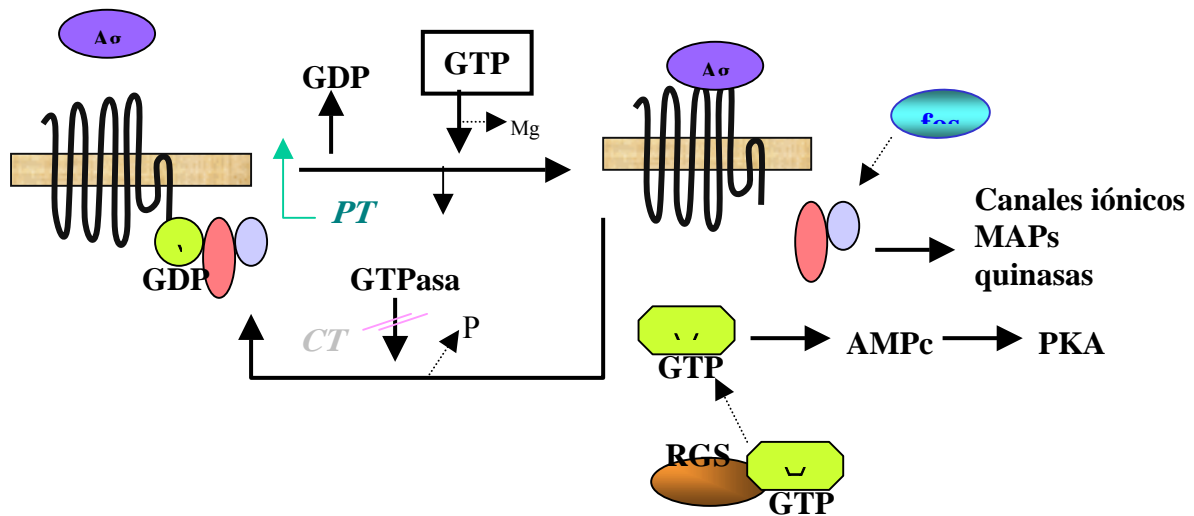


Figura 2. La unión del agonista al complejo receptor-proteína G provoca un cambio conformacional que permite la disociación de GDP y la unión a GTP, cuya concentración intracelular es mucho mayor, con lo que la proteína G se activa e induce su disociación de las subunidades  $\beta\gamma$  y del receptor. Tanto la subunidad  $\alpha$  unida a GTP, como el dímero  $\beta\gamma$ , pueden modular efectores hasta que la actividad intrínseca de subunidad  $\alpha$  la inactiva al hidrolizar el GTP. Esto conduce a la reasociación del heterotrímero, disponible así para un nuevo ciclo de activación.

La toxina colérica (CTX), tiene la capacidad de unir covalentemente el grupo ADP-ribosa a la subunidad  $\alpha$  de Gs manteniéndola activa permanentemente, mientras que la toxina pertúsica (PTX) ADP-ribosila la subunidad  $\alpha$  en el heterotrímero, de tal forma que, al no permitir la disociación de las subunidades, no pueden ser reguladas por el receptor.

su participación en la activación directa de canales iónicos. La subunidad  $\alpha$  finaliza su acción estimuladora hidrolizando la molécula de GTP a GDP, debido a su capacidad GTPasica intrínseca. La vuelta al estado inicial lleva consigo la reasociación de las tres subunidades y su unión con el receptor. En los últimos años

se han descrito una serie de mecanismos inhibitorios de la señalización mediada por las proteínas G, uno de ellos implica a una proteína citosólica denominada **fosducina**, presente en altas cantidades en la retina, (Lee y col., 1987) y a sus homologas conocidas como tipo fosducina, las cuales se expresan en cerebro y otros tejidos (Bauer y col., 1992; Lee y col., 1992; Schultz y col., 1996). Las fosducinas tienen una gran afinidad por el complejo  $G\beta\gamma$  al cual se unen, bloqueando la activación de efectores inducida por la estimulación de las proteínas G e impidiendo la reasociación del heterotrímero. A su vez la fosducina puede ser fosforilada por un mecanismo que implica a la quinasa proteica A (PKA) con lo que sus efectos inhibitorios sobre las proteínas G se pierden.

Por otra parte, las proteínas G pueden ser inhibidas, igualmente, por una serie de proteínas que estimulan la actividad GTPásica de la subunidad  $\alpha$ , de forma que aumenta el tiempo en que las proteínas G permanecen en su estado inactivo. Esta familia de proteínas son conocidas como **RGS** (reguladoras de la señalización de las proteínas G) y se expresan en diversos tejidos incluyendo el cerebro (Dohlman y col., 1997; Berman y col., 1998; Hepler y col., 1999). Estudios en sistemas reconstituidos han demostrado que las RGS pueden incrementar la hidrólisis de GTP en mas de 100 veces y que su eficacia y especificidad puede estar influenciada por modificaciones lipídicas en su terminal amino.

Otra característica del ciclo de las proteínas G es su capacidad de autorregulación. La regulación de la hidrólisis de GTP garantiza que la activación del ciclo no se va a mantener indefinidamente. Por tanto, los análogos no hidrolizables del GTP (como Gpp(NH)p ó  $GTP\gamma S$ ) resultan valiosas herramientas en la investigación, puesto que permiten mantener disociadas las proteínas G de forma

continuada (Stryer y Bourne, 1986). Este ciclo de activación-desactivación, puede ser modificado por la acción de otras proteínas moleculares de las que comentaremos más adelante.

### **1.3 Subunidades que integran los heterotrímeros**

#### **1.3.1 Subunidad $\alpha$**

La subunidad  $\alpha$  presenta actividad GTPásica intrínseca, además de un único sitio de afinidad para la unión de nucleótidos de guanina (Gilman, 1987), sus características determinan la subfamilia dentro de la cual se ubica el trímero y determina la especificidad de la proteína G por un receptor y un efector concreto. Se han clonado en mamíferos al menos 21 subunidades  $G\alpha$  distintas, que provienen de la expresión de 17 genes, en algunos casos por lecturas alternativas (Jones y Reed, 1987; Matsuoka y col., 1988; revisado en Wickman y Clapham, 1995; Huirowitz y col., 2000). Son proteínas de 39-52 kDa, que presentan una homología en su secuencia de aminoácidos entre el 45-95% (Rens-Domiano y Hamm, 1955), de acuerdo con la cual se han agrupado en cuatro familias (Tabla 1). Las subunidades  $G\alpha$  que median la activación de la adenilato ciclasa pertenecen a la **familia  $G\alpha_s$** , incluye 4 isoformas de  $\alpha_s$  generadas por lectura alternativa de un único gen, junto con  $G\alpha_{olf}$ , y son capaces de estimular canales de calcio dependiente de voltaje (Yatani y col., 1987 y 1998a; Dolphin, 1991). Las proteínas  $G\alpha_s$  se encuentran presentes prácticamente en todos los tejidos, incluyendo el SNC donde los niveles más altos de la  $G\alpha_s$  de 52 kDa se localizan en la corteza frontal y los de 45 kDa en el caudado (Young y col., 1993); sin embargo el subtipo  $G_{olf}$  aparece únicamente en tejidos neurales específicos y es especialmente abundante en el tejido olfatorio.

Tabla 1. Clases de subunidades  $\alpha$  de las proteínas G.

<i>Famili</i>	<i>Subtipo</i>	<i>Expresión</i>	
<b>Gs</b>	$\alpha^s$	Epitelio	8 Adenilato
	$\alpha^{sL}$		8 Canal de
	$\alpha^{olf}$		
	$\alpha^{t-r}$	Retina	
	$\alpha^{t-c}$	Retina (conos)	8
	$\alpha^{gust}$	Papilas	9 Adenilato
	$\alpha^i$	Varios	8 Canal de
	$\alpha^i$		9 Canal de
	$\alpha^i$		
	$\alpha^{o1}/\alpha^{o2}$		
	$\alpha^z$	Cerebro y	
	$\alpha^q$		9 Adenilato
	$\alpha^{11}$		8 Fosfolipasa
	$\alpha^{14}$	Ubícuas	
	$\alpha^{15}/\alpha^1$	Varios	
	$\alpha^{12}$		8 Intercambio
	$\alpha^{13}$		

Tomado de Neer ,1995

La familia de proteínas **G<sub>i</sub>** recibió el nombre al ser asociadas en un principio con la inhibición del sistema enzimático de la AC y en contraposición al entonces

bien conocido grupo de la  $G_{\alpha_s}$ , que estimulan dicho sistema (Bokoch y Gilman, 1984; Okajima y Ui, 1984) y aunque en la actualidad también se las relaciona con otros efectores como son los canales de  $K^+$  y de  $Ca^{2+}$  (Yatani y col., 1988b) a través de los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos,  $D_2$ -dopaminérgicos,  $m_2$ ,  $m_3$  y  $m_4$ -muscarínicos,  $A_2$ -purinérgicos, de somatostatina, opiodes (Freissmuth y col., 1991; Kurose y col., 1986; Milligan y col., 1985; Murray-Whelan y Schlegel, 1992; Strosberg, 1991; Ueda y col., 1988), la relación con la inhibición de la AC sigue siendo su principal característica.

Se han clonado los ADNc de tres subtipos diferentes de  $\alpha_i$  que presentan una homología. A diferencia de lo que sucede con las clases  $G_s$  y  $G_o$  cuyos subtipos provienen de lecturas distintas de un mismo gen, los tres ADNc de los subtipos de la clase  $G_i$  provienen cada uno de un gen diferente (Beals y col.; 1987; Suki y col., 1987). La traducción de estos genes predice unas secuencias para las subunidades  $\alpha$ , denominadas  $\alpha_{i1}$ ,  $\alpha_{i2}$  y  $\alpha_{i3}$  en base al orden en que fueron clonadas (Suki y col., 1987), de 354, 355 y 354 aminoácidos respectivamente, con una similitud entre el 87 y el 93% entre los aminoácidos de sus secuencias. En SDS-PAGE presentan un peso molecular aparente entre 40-41 kDa. Las tres subunidades son ADP ribosilables por la PTX cuando están formando parte del trímero y por la CTX en su forma disociada.

Los tres subtipos están ampliamente distribuidos en cerebro y en la mayoría de los órganos periféricos. En el cerebro de rata, la  $G_{\alpha_{i1}}$  se encuentra más abundante en el bulbo olfatorio, núcleo accumbens, amígdala, locus coeruleus y en la corteza cerebral; la  $G_{\alpha_{i2}}$  presenta los niveles más elevados en el hipotálamo, estriado, bulbo olfatorio, hipocampo y corteza cerebral (Asana y col., 1990; Ordford

y col., 1991; Berti-Mattera y col., 1992; Young y col., 1993). La  $G\alpha_{i3}$  es la que presenta una distribución más restringida, lo que unido al alto grado de conservación de su secuencia entre las especies sugiere una gran especificidad en su función (Kim y col., 1988). Aunque se ha demostrado que todas ellas están implicados en la inhibición de la AC (Simonds y col., 1989; Kobayashi y col., 1990; Gerhardt y Neubig, 1991) y en la estimulación de canales de  $K^+$  (Yatani y col., 1988b; Mattera y col., 1989) cada una de ellas parece tener, además una predilección por un determinado tipo de efector. Así, por ejemplo, se ha dicho que la  $G\alpha_{i1}$  pudiera ser capaz también de tener una función estimuladora de fosfolipasas (Codina y col., 1988). La  $G\alpha_{i3}$  sería la más directamente implicada en los procesos de regulación de canales de  $K^+$  (Codina y col., 1988) y en ciertos tipos de células se le ha relacionado con procesos de transporte vesicular y exocitosis (Aridor y col., 1993).

La **familia Gq**, formada por  $\alpha_q$ ,  $\alpha_{11}$ ,  $\alpha_{14}$ ,  $\alpha_{15}$  y  $\alpha_{16}$ , activan la fosfolipasa C tipo  $\beta$  de fosfoinosítidos. Todas las proteínas que se agrupan en esta clase carecen del lugar de modificación para la PTX y activan a diferentes miembros de la PLC, al menos a las isoformas  $\beta$  (Sternweiss y Smrcka, 1992).  $G\alpha_q$  y  $G\alpha_{11}$  están ampliamente distribuidas en los tejidos, incluido el SNC, además de en múltiples líneas celulares (Milligan, 1993a) y difieren únicamente en un 12% de su secuencia localizándose la mayoría de las diferencias en el extremo amino-terminal. Esta zona parece ser importante para determinar la especificidad de la interacción con el complejo  $\beta\gamma$ .  $G\alpha_{14}$  se encuentra fundamentalmente en células epiteliales, mientras que  $G\alpha_{15}$  y  $G\alpha_{16}$  se localizan en células hematopoyéticas. Esta especificidad en su distribución podría significar una función muy especializada de estas proteínas (Hepler y Gilman, 1992).



La familia **G<sub>12</sub>** con  $\alpha_{12}$  y  $G\alpha_{13}$  se expresan en la mayoría de los tejidos y son resistentes a la modificación por PTX. Sabemos poco sobre la función de éstas proteínas.

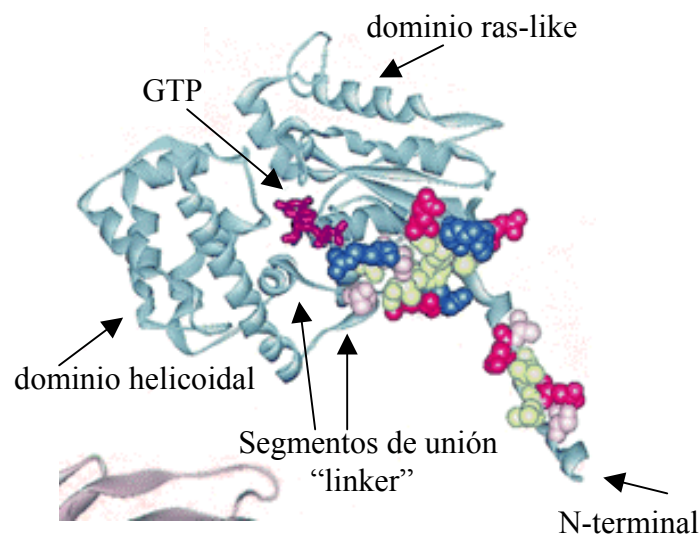
#### 1.3.1.1. *Estructura de la subunidad $\alpha$*

En la estructura de las subunidades  $G\alpha$  se distinguen dos dominios (Figura 3) un dominio similar a la proteína RAS ( $\Delta$ Ras-like<sup>@</sup>), común a todas las proteínas de la familia de las GTPasas, y un dominio llamado helicoidal por su estructura de hélice  $\alpha$ , que no está presente en las GTPasas de bajo peso molecular. El primero contiene lugares implicados en la unión e hidrólisis de los nucleótidos de guanina, el sitio de unión para iones  $Mg^{2+}$ , el residuo R diana de la ADP-ribosilación por toxina colérica (CTX), así como sitios de interacción con dímeros  $\beta\gamma$ , receptores y efectores.

En este dominio se distinguen 3 regiones  $\Delta$ switch<sup>@</sup> adyacentes (residuos S173-T183, F195-T215 y D227-R238 en  $G\alpha_t$ ), claves en los cambios conformacionales nucleótido-dependientes de la subunidad  $G\alpha$  durante el ciclo de activación-desactivación de la proteína G. Concretamente, algunos residuos de las regiones switch I y II, como R174 de  $G\alpha_t$  (178 en  $G\alpha_{i1}$ ), diana de la CTX, o Q200 de  $G\alpha_t$  (204 en  $G\alpha_{i1}$ ), establecen interacciones fundamentales para hidrólisis de GTP (Noel y col., 1993; Sondek y col., Coleman y col., 1994).

La función del dominio helicoidal no está bien definida, pero podría contribuir a la mayor velocidad de hidrólisis de GTP que poseen intrínsecamente las subunidades  $\alpha$  de las proteínas G heterotriméricas en comparación con las demás

GTPasas (Markby y col., 1993).



**Figura 3. Estructura general de la subunidad  $\alpha$  de la transducina donde se muestran los dominios GTPasa o  $\alpha$ Ras-like y helicoidal, los segmentos de unión ( $\alpha$ linker) que los interconectan así como el dominio de unión de nucleótidos (Lambright y col., 1996).**

El extremo amino terminal de la subunidad  $\alpha$  participa en la unión con el complejo  $\beta\gamma$  (Lambright y col., 1996). Por otra parte, dado que la ADP-ribosilación de las subunidades  $\alpha$  bloquea la interacción de la proteína G con el receptor y que la presencia de anticuerpos específicos contra el extremo carboxilo terminal previene la activación de las proteínas G mediada por el receptor, se piensa que el extremo carboxilo terminal es el implicado en la relación con el receptor (Masters y col.,

1988; Clapham y col., 1996).

La resolución de la estructura cristalográfica de las subunidades  $G\alpha_t$  y  $G\alpha_{i1}$  unidas a GDP,  $GTP\gamma S$  o  $AIF^{4-}$  (Noel y col., 1993; Lambright y col., 1994; Sondek y col., 1994; Coleman y col., 1994; Mixon y col., 1995), así como de trabajos más recientes con los heterotrímeros (Wall y col., 1995; Lambright y col., 1996), han aportado gran información sobre la disposición espacial de la subunidad  $G\alpha$  y los dominios clave para los cambios estructurales que experimenta al ser activada.

Las subunidades  $G\alpha$  pueden sufrir distintas modificaciones covalentes post-traduccionales de gran relevancia funcional (Yamane y Fung, 1993): ADP-ribosilaciones, prenilaciones, acilaciones y fosforilaciones. Así determinados subtipos de  $G\alpha$  pueden ser ADP-ribosilados específicamente por toxinas bacterianas. La toxina colérica (CTX), (producida por *Vibrio cholerae*), actúa sobre las subunidades  $\alpha_s$  y  $\alpha_{olf}$  libres, introduciendo un grupo ADP-ribosa desde el NAD (nicotinamida adenina nucleótido) a un residuo de arginina de las subunidades  $\alpha$  de dichas proteínas G.

La toxina pertúsica (PTX), (de *Bordetella pertussis*), ADP-ribosila las subunidades  $G\alpha_t$ ,  $G\alpha_{gust}$ ,  $G\alpha_i$  y  $G\alpha_o$  en residuo C4 a partir del extremo carboxi-terminal. Otras subunidades  $\alpha$  carecen de este residuo diana para la toxina. El sustrato preferente de esta toxina es la forma heterotrimérica de la proteína G, por lo que su actividad se potencia en presencia de dímeros  $G\beta\gamma$ . Esta modificación conlleva el desacoplamiento entre receptor y proteína G.

Entre las modificaciones post-traduccionales de las subunidades  $G\alpha$ , las de

naturaleza lipídica, tales como las acilaciones (miristoilaciones o palmitoilaciones) (Bigay y col., 1994; Wedegaertner y col., 1995), son importantes para la localización y funcionalidad de la subunidad, contribuyendo, junto con las interacciones  $\alpha$ - $\beta\gamma$ , a su anclaje a la membrana (Milligan y col., 1995b). Algunas subunidades  $\alpha$  pueden ser fosforiladas por proteína quinasa C (PKC) (Fields y Casey, 1995; Kozasa y Gilman, 1996), lo que afecta a su interacción con el dímero  $G\beta\gamma$ .

### **1.3.2 Subunidades $\beta\gamma$ .**

Las subunidades  $\beta\gamma$  forman un dímero que sólo puede disociarse en condiciones desnaturalizantes. La Tabla 2, muestra las variantes de estas subunidades, su distribución y los efectores que modulan. Se conocen cinco isoformas de las subunidades  $\beta$ , de aproximadamente 36 kDa, que muestran entre un 50% y un 83% de homología de secuencia y trece subunidades  $\gamma$ , de 6-9 kDa, que presentan mayor variedad. Las subunidades  $\gamma$  presentan modificaciones covalentes que incluyen prenilación (con grupos farnesilo grupos geranilgeranil) y carboximetilación en la Cys C terminal, las cuales permiten su asociación a la membrana y regulan la interacción del dímero con las subunidades  $\alpha$ , los receptores y algunos efectores (Wedegaertner y col., 1995). No todas las combinaciones  $\beta\gamma$  parecen igualmente probables y aunque son intercambiables entre las distintas subunidades  $\alpha$  in vitro, aún no se conoce bien el grado de especificidad de las interacciones entre ellas, que podría determinar la preferencia por combinaciones heterotriméricas específicas.

**Tabla 2. Variantes de subunidades  $\beta\gamma$ , distribución y efectores que**

modulan.

<b>Subtipo</b>		<b>Efectores modulados por los dímeros <math>\beta\gamma</math></b>
$\beta_1$	Varios	
$\beta_2$	Varios	
$\beta_3$	Varios	
$\beta_4$	Varios	8 Adenilato
$\beta_5$		9 Adeniato
		8 Fosfolipasa
$\gamma_1$	Retina	8 Fosfolipasa
$\gamma_{\text{conos}}$	Retina	8 Fosfoinosítido
$\gamma_2$		8 Canal de
$\gamma_3$	Cerebro	
$\gamma_4$	?	
$\gamma_5$	Varios	
$\gamma_7$	Varios	

Tomado de Neer ,1995

Por lo que respecta a sus funciones, los dímeros  $\beta\gamma$  participan, en primer lugar, en el reconocimiento de las proteínas G por los receptores, los cuales presentan baja afinidad por las subunidades  $\alpha$  disociadas. En esta función parece

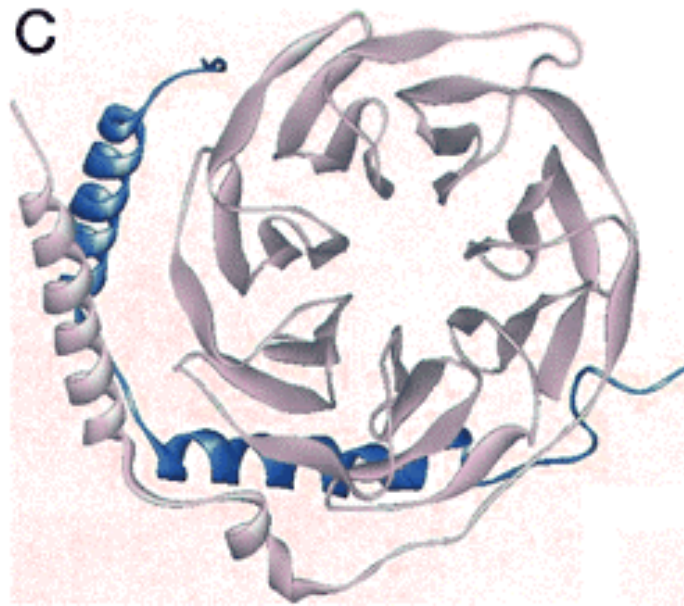
existir selectividad de isoformas de las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ , como han mostrado Kleuss y col (1992,1993). Así mismo, su disociación de las subunidades  $\alpha$  cuando estas se activan conduce a la separación del receptor, el cual puede actuar de nuevo catalizando la activación de nuevas moléculas de proteína G y permitiendo la amplificación de la señal.

Durante mucho tiempo la capacidad de estabilizar a las subunidades  $\alpha$  fue la principal función asignada para el dímero  $\beta\gamma$ , actualmente se sabe que estos dímeros son capaces de modular efectores por sí mismos (Clapham y Neer, 1993). En este sentido, se han descrito efectos directos de los complejos  $\beta\gamma$  sobre efectores celulares purificados. Los complejos  $\beta\gamma$  estimulan la PLA<sub>2</sub> en la retina, activan canales de K<sup>+</sup> regulados por acetilcolina del corazón, activan determinadas isoformas de la PLC ( $\beta_2$  y  $\beta_3$ ) y tienen un efecto dual sobre la AC estimulando las isoformas AC-II y AC-IV e inhibiendo la AC-I (Camps y col., 1992; Jelsema y Axelrod, 1987; Katz y col., 1992; Logothetis y col., 1987; Tang y Gilman, 1991; Sternweiss,1995). Estas acciones cesan, al igual que las de las subunidades  $\alpha$ , con la reagrupación del heterotrímero.

#### 1.3.2.1. Estructura del dímero $\beta\gamma$

Por estudios cristalográficos se conoció la estructura tridimensional de dímeros  $\beta\gamma$  libres (Sondek y col., 1996 [ $G \beta_1\gamma_1$ ]) y heterotrímeros  $G \alpha\beta\gamma$  (Wall y col.,1995 [ $G \alpha_i\beta_1\gamma_2$ ]; Lambright y col; 1996 [ $G \alpha_i\beta_1\gamma_1$ ]) La subunidad  $G\beta$  adopta una forma cilíndrica de hélice  $\beta$  integrada por siete palas (láminas  $\beta$ ), que dejan en el centro de la hélice un poro (Figura 4). Esta estructura es reflejo de la cadena aminoacídica, que contiene siete repeticiones de una secuencia de unos 40

aminoácidos entre los que hay residuo altamente conservados. En estas secuencias conservadas aparece repetido el dipéptido triptófano-aspartato (W-D), motivo que se encuentra también en muchas proteínas no relacionadas funcionalmente con la transducción y que podría ser importante para establecer interacciones con otras proteínas (Neer y col., 1994)



**Figura 4. Dominios de las subunidades G $\beta\gamma$  en donde las hélices representan el N-terminal de cada una de las subunidades. Se aprecian las 7 palas de la subunidad  $\beta$  en gris. La subunidad  $\gamma$  está representada en azul; los dominios N-terminal helicoidales, están íntimamente unidos.** Tomada de Lambright y col., 1996

Las subunidades  $\gamma$  tienen una estructura tridimensional casi lineal, a excepción de su extremo amino-terminal helicoidal. Sufren modificaciones post-traduccionales en el extremo carboxilo-terminal (isoprenilaciones, metilaciones), lo que confiere mayor diversidad (Casey, 1994). En ausencia de isoprenilación el

dímero  $G\beta\gamma$  se forma, pero no interacciona correctamente con la membrana ni con la subunidad  $G\alpha$  (Higgins y Casey, 1994), viéndose comprometida la activación de la proteína G por los receptores (Scheer y Gierschik, 1995) y por tanto su papel modulador de los efectores. Así mismo, se ha descrito fosforilación por PKC de algunas subunidades  $\gamma$ , lo que podría tener relevancia fisiológica (Morishita y col., 1995).

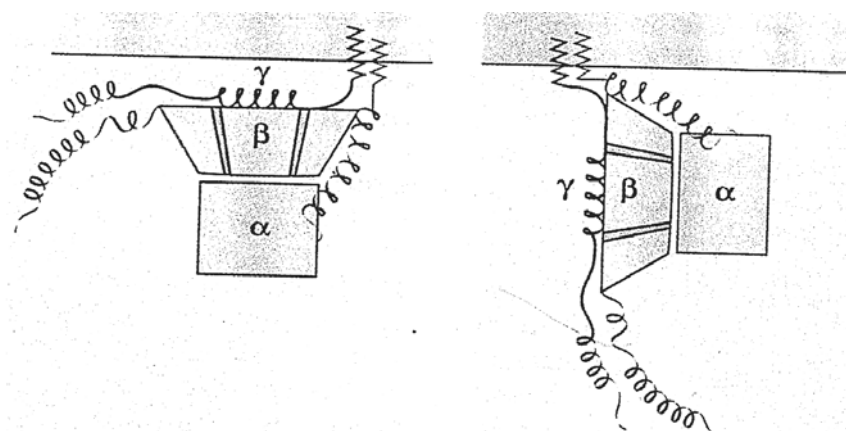
Las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  funcionan fuertemente asociadas mediante interacciones no covalentes y sólo se disocian en condiciones desnaturalizantes. La subunidad  $\gamma$  se extiende a lo largo de un extremo de la estructura en hélice de la subunidad  $\beta$ , estableciéndose entre ambas una extensa zona de interacciones hidrofóbicas y polares que confieren especificidad de unión  $\beta$ - $\gamma$  (Katz y Simon, 1995). Alejados de la hélice  $\beta$ , también los extremos aminoterminal helicoidales de ambas subunidades se enrollan entre sí, estableciéndose interacciones mayoritariamente hidrofóbicas. Estas subunidades aparecen en estructuras nativas formando parte de la proteína G heterotrimérica, en asociación con una subunidad  $\alpha$ , o como una mezcla de dímeros  $\beta\gamma$  no dissociables (Neer y Clapham, 1988).

### **1.3.3 Interacciones $G\alpha$ - $G\beta\gamma$**

La estructura de los heterotrímeros nos revela el conjunto de uniones nucleótido-dependientes que se establecen entre  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$ , y que van a regular la interacción de estas subunidades con receptores y moléculas efectoras. La subunidad  $\alpha$  establece con  $\beta$  interacciones hidrofóbicas poco específicas. Existen dos sitios fundamentales de contacto de  $\alpha$  con  $\beta$ : el extremo amino-terminal de la



subunidad  $\alpha$  miristoilado ó palmitoilado y el dominio catalítico de esta subunidad, regiones switch I y II o residuos próximos a ellas (Lambright y col., 1996; Coleman y Sprang, 1996). Tanto los extremos amino- y carboxilo-terminales de  $G\alpha$  como las regiones switch I y II sufren cambios conformacionales cuando esta subunidad interacciona con el dímero  $G\beta\gamma$  o tras la unión de nucleótidos.



**Figura 5.** En esta figura mostramos dos posibles orientaciones ortogonales de  $G\alpha\beta\gamma$  con respecto a la bicapa lipídica, teniendo en cuenta la relevancia en la transducción de señales de la formación de complejos con otras proteínas . Si bien no ha sido todavía demostrado, la orientación B por su apropiada disposición sea la más probable. Le Vine 1999

A diferencia con las interacciones extensas con  $G\beta\gamma$ , los estudios cristalográficos no han podido determinar interacciones directas entre  $G\alpha$  y  $G\gamma$ , ya que los primeros cinco residuos de  $G\alpha$ , así como los primeros ocho y últimos cuatro residuos de  $G\gamma$ , aparecen desordenados. Por tanto no se puede descartar la

posibilidad de que tales interacciones, entre  $G\alpha$  y  $G\gamma$ , puedan ocurrir en una configuración más fisiológica. Sin embargo la extensión de tal interacción sería limitada. Por otra parte, grupos acilados del extremo amino-terminal de  $G\alpha$  y prenilados del extremo carboxilo terminal de  $\gamma$  quedan próximos y parecen insertarse simultánea y cooperativamente en la bicapa lipídica de la membrana plasmática, contribuyendo así a la estabilidad del trímero (Fig 5).

Estos sitios modificados post-traduccionalmente, junto con las regiones de  $\alpha$  que interaccionan con el receptor, se presentan hacia una misma cara del trímero, de forma que la proteína G tiene una orientación concreta con respecto a la membrana (Bigay y col., 1994; Lambright y col., 1996.); estas acilaciones de  $G\alpha$ , como veremos más adelante, van a ser de gran importancia en la interacción con otras proteínas (Chun y col., 1996; Lisanty y col., 1994, 1997; Ponimaskin y col., 2000). Así pues, el dímero  $G\beta\gamma$ , además de regular efectores, mantiene a la subunidad  $G\alpha$  inactiva, unida a GDP, al tiempo que la orienta de forma accesible para los dominios citoplasmáticos de los receptores.

#### **1.3.4 Interacción con efectores**

Las proteínas G transmiten las señales desde el receptor hasta los efectores, constituidos por sistemas enzimáticos como la AC, la PL y la fosfodiesterasa específica de GMPc, transportadores de magnesio y glucosa y canales iónicos de  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Na^+$ . El sistema efector más relacionado en los efectos opioides es la AC, cuyo sustrato es un complejo formado por el ATP y un metal (habitualmente el  $Mg^{2+}$ ) que genera como segundo mensajero el AMPc, encargado de transmitir el mensaje al interior celular, donde es activada una proteína quinasa que a su vez fosforila

diversas proteínas específicas dando lugar a la respuesta celular final (Avidor-Reiss y col., 1997; Eckhardt y col., 2000).

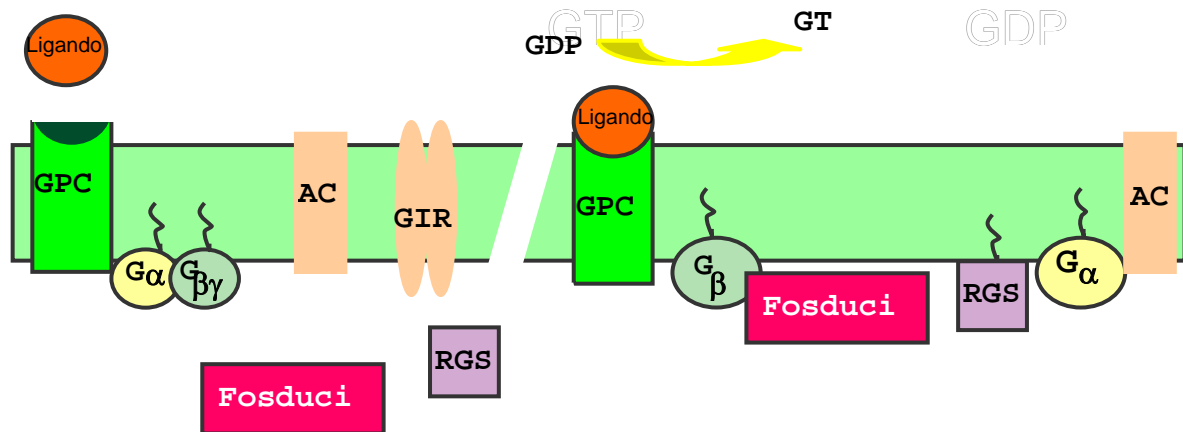
#### 1.3.4.1 *Interacciones $G\alpha$ -efectores.*

Como hemos indicado anteriormente, las subunidades  $G\alpha$  unidas a GTP y activas interactúan con múltiples efectores: adenilato ciclasas, fosfolipasas  $C\beta$ , fosfodiesterasas del GMP cíclico, canales iónicos (DeVivo e Iyengar, 1994), a través del dominio GTPasa, estando implicada la región switch II (Berlot y Bourne, 1992; Rarick y col., 1992; Neer, 1995; Coleman y Sprang, 1996). El extremo carboxilo-terminal de  $G\alpha$  parece ser también un lugar de interacción tanto con receptores como con efectores (Masters y col., 1988; Clapham, 1996)

En mamíferos han sido clonadas 9 isoformas de AC, describiéndose para algunas de ellas formas derivadas de lecturas alternativas de sus ARN mensajeros (Iyengar, 1993; Hellevuo y col., 1995; Premont y col., 1996; Cali y col., 1996). Son proteínas de 1080-1353 aminoácidos; presentan sitios de posible N-glicosilación y poseen un extremo amino-terminal corto y dos regiones altamente hidrofóbicas ( $M_1$  y  $M_2$ ), poco conservadas entre las distintas isoformas, seguida cada una de ellas por un dominio más conservado ( $C_1$  y  $C_2$ ).

Por su estructura primaria se cree que el extremo amino-terminal es citoplasmático en todos los casos, que ambas regiones hidrofóbicas atraviesan la membrana 6 veces y que  $C_1$  y  $C_2$  constituyen largos dominios citosólicos, sirviendo  $C_1$  como unión entre las dos regiones transmembranales. Estos dominios citoplasmáticos pueden constituir la región catalítica de la enzima (Tang y Gilman,

1992; Iyengar, 1993).



**Figura 6. Regulación de las adenilato ciclasa de mamíferos.** R, receptor /TM;  $G_s$  y  $G_i$  proteínas G que estimulan o inhiben respectivamente la AC; CaM, calmodulina; 3'AMP adenosina 3' monofosfato; en engrita: regiones de alta homología de secuencia aminoacídica entre las distintas isoformas (Tang y Gilman 1992)

Las distintas isoformas de AC se clasifican en 6 subfamilias en base a sus similitudes estructurales y sus características funcionales. Se observan diferencias en su actividad basal y, aunque todas son estimuladas por subunidades  $G_{\alpha_s}$  y forskolina, son reguladas de forma diferente por diversas moléculas (subunidades  $\alpha$  o dímeros  $\beta\gamma$ ,  $Ca^{2+}$ -calmodulina, PKC) (Tang y Gilman, 1992; Iyengar, 1993; Cooper y col., 1995). Así por ejemplo, el efecto del  $Ca^{2+}$  sobre la actividad de distintas isoformas de la enzima puede ser nulo (AC II, IV, VII ó IX), estimulador (AC I, III ó

VIII) o inhibidor (AC V ó VI). Los dímeros  $G\beta\gamma$  pueden no afectar (AC V, VI, IX), activar (AC II, IV) o inhibir AC I) a la enzima.

La PKC estimula únicamente a algunas isoformas (AC II, VII) (Cooper y col., 1995; Premont y col., 1996). Estas diversas AC no se distribuyen de igual forma en el organismo; todas están presentes en el S.N.C (Hellevuo y col., 1996), pero sólo tres tipos (AC I, II y V) se expresan de forma significativa, concentrándose a nivel subcelular selectivamente en zonas sinápticas (Mons y col., 1995). Esta localización subcelular permite a las enzimas responder rápidamente a entradas de  $Ca^{2+}$  en la célula asegurando la integración de los dos grandes sistemas de segundos mensajeros intracelulares (AMPc y  $Ca^{2+}$ ).

#### 1.3.4.2. *Interacciones $G\beta\gamma$ -efectores.*

Los dímeros  $\beta\gamma$  participan en un gran número de acciones mediadas por proteínas G (Clapham y Neer, 1993). Muchos trabajos recientes demuestran la activación directa por dímeros  $G\beta\gamma$  de moléculas efectoras tales como canales de  $K^+$  (Logothetis y col., 1987; Reuveny y col., 1994; Wickman y col., 1994; Huang y col., 1995), canales de  $Ca^{2+}$  tipo N y P (Ikeda, 1996; Herlitze y col., 1996) isoformas de la PLC- $\beta$  (1,2 y3) y PLC $\delta$ 1 (Camps y col., 1993; Stehno-Bittel y col., 1995), fosfolipasa A2 (PLA2) (Jeselma y Axelrod, 1987; Kim y col., 1989), quinasas de fosfoinosítidos (Morris y col., 1995), tirosina quinasa (Langshans-Rajasekaran y col., 1994; Ito y col., 1995; Van Biesen, 1995) o la quinasa 2 de receptores acoplados a proteínas G (GRK2) (Pitcher y col., 1992; Haga y col., 1994). La capacidad de los dímeros  $G\beta\gamma$  para interaccionar con proteínas que posean dominios de homología de plextrina (dominios PH) (Koch y col., 1993; Touhara y col., 1994) amplía el

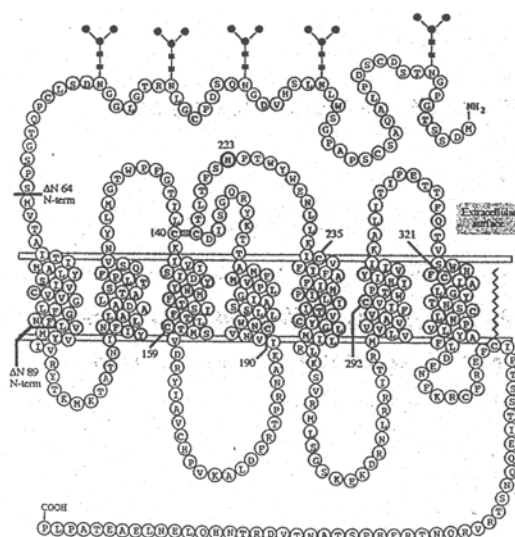
abanico de sus posibles papeles fisiológicos. Las subunidades  $\beta\gamma$  regulan las distintas isoformas de las enzimas efectoras de manera muy específica (Tang y Gilman, 1991; Smrcka y Sternweis, 1993), y se observan diferencias entre los distintos dímeros  $G\beta\gamma$  en cuanto a capacidad para regular una isoforma determinada (Boyer y col., 1994). Los sitios de interacción entre  $G\beta\gamma$  y sus efectores son poco conocidos, pudiendo estar implicados residuos de ambas subunidades (Leberer y col., 1992; Grishin y col., 1994). Mientras que la activación de  $G\alpha$  requiere una reorganización estructural nucleótido-dependiente de esta subunidad, la activación de  $G\beta\gamma$  es únicamente consecuencia de su disociación del trímero. Esto atribuye a la subunidad  $\alpha$ -GDP un papel como regulador negativo de  $G\beta\gamma$  (Hamm y Gilchrist, 1996).

## **2. Receptores acoplados a proteínas G**

Hasta el presente, el papel de la proteínas G se asociaba a la iniciación de la señalización mediada a través de receptor. Estos receptores acoplados a proteínas G forman una superfamilia que comprende múltiples especies moleculares diferentes, aunque manteniendo unos elementos estructurales comunes. Tienen entre 450 y 600 aminoácidos constituyendo una única cadena polipeptídica, con siete dominios transmembranales hidrofóbicos (TI-TVII), en forma de  $\alpha$ -hélices que atraviesan la membrana. Es precisamente en estos dominios donde se mantiene la similitud de secuencia entre los receptores acoplados a proteínas. Estas regiones transmembranales están conectadas entre sí por unos lazos hidrofílicos extracelulares (e1,e2 y e3) e intracelulares (i1,i2 ei3). El grupo amino terminal se sitúa en el exterior de la célula y es donde se anclan los residuos glucídicos, mientras que el carboxilo terminal se localiza intracelularmente junto con los dominios citosólicos (Figura 7). Otra característica de esta proteína es que posee un lazo, en el interior de la célula, que une el quinto y sexto segmentos transmembranales, y que pueden tener una longitud muy variable (Rens-Domiano y Hamm., 1995; Wung y col., 1994). Este lazo es importante ya que constituye una región del receptor muy importante en su interacción con las proteínas G.

La principal misión de los receptores acoplados a proteínas G es la de reconocer un ligando específico entre la variedad de moléculas presentes en el espacio extracelular y transmitir la información a través de la membrana plasmática. Al interaccionar el transmisor con el receptor en la cara externa de la membrana celular se produce un cambio conformacional en los dominios citosólicos. Estos cambios en zonas alejadas del propio lugar de interacción se conocen como modificaciones alostéricas.

Una idea errónea ampliamente difundida es la de que cada receptor G, al ser estimulado por el agonista solamente puede unirse a un tipo de proteína G. Los ejemplos de activación de distintas proteínas G por el mismo receptor son cada vez más numerosos. La misma señal transmisora frecuentemente activa simultáneamente una enzima de membrana y un canal al reclutar distintas proteínas G (Kenakin , 1995b, Garzón y col 1997). Así, una misma proteína G puede reclutar distintos efectores en la cascada de generación de segundos mensajeros.



**Figura 7. Secuencia aminoacídica y estructura propuesta para el receptor opiode  $\mu$  clonado de rata. Se indican los posibles lugares de glicosilación (residuos ramificados) y un residuo palmitoilado en el extremo carboxilo terminal, cuyo grupo se inserta en la bicapa lipídica. Tomado de Shahrestanifar y col., 1996**

Respecto a la unión entre el receptor y sus ligandos, se ha demostrado que un residuo aspartato, muy conservado en los diferentes receptores conocidos y localizado en el segmento TII, es crítico para la unión de los agonistas al receptor. Este hecho se ha podido comprobar en el caso del receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico



(Horstman y col., 1990) y también en el caso del receptor opioide  $\delta$ , descubriéndose además diferencias en los requisitos de unión de los agonistas selectivos frente al de los antagonistas y agonistas no selectivos (Kong y col., 1993).

Como ya hemos mencionado anteriormente, la comparación de las secuencias de aminoácidos de los miembros de la familia de los receptores acoplados a proteínas G, ha llevado a la identificación de una serie de residuos conservados que se localizan en los segmentos transmembranales hidrofóbicos. Algunos aminoácidos se conservan en la mayoría de estos receptores a pesar de las diferencias estructurales de los ligandos que se unen a ellos: catecolaminas, péptidos y hormonas glicoproteicas, lo que induce a pensar que estos residuos tan conservados tengan un papel funcional o estructural en el proceso de activación del receptor. Tales residuos son: Gly-Asn en el TM1; Leu-Ala-X-X-Asp-Leu en el TM2; Asp-Arg-Tyr en la unión entre el Tm3 y el i2; Trp en el TM4, y una Pro, rodeada de aminoácidos aromáticos, en el TM5, TM6 y TM7. Existen otros aminoácidos que solo se conservan en una subfamilia de estos receptores y que jugarían un papel muy específico dentro de este grupo( Wang y col., 1995; Metzger y Ferguson ., 1995).

Por otro lado, en muchos de los receptores acoplados a proteínas G, se encuentra un residuo Cys muy conservado en el extremo carboxilo que se encuentra en la mayoría de los casos palmitoilado. Esta palmitoilación puede servir de ancla del extremo carboxilo del receptor a la membrana, controlando de esta manera la estructura terciaria de esta región del receptor. La sustitución de esta Cys por una Gly en el receptor  $\beta$ -adrenérgico, da lugar a una pérdida de la capacidad del receptor de activar las proteínas G (O=Dowd y col., 1989), sugiriendo que la naturaleza de cadena lateral es crítica para la función del receptor. Además,

muchos receptores acoplados a proteínas G tienen serinas o treoninas, bien en el tercer lazo citoplasmático, en el extremo carboxilo o en ambos, que corresponden a sitios de fosforilación .

## **2.1 Interacciones Receptor-Proteínas G**

Como hemos indicado, todos los receptores que se acoplan a proteínas G tienen en común una estructura con siete dominios transmembrana. Tanto la subunidad  $\alpha$  como el dímero  $\beta\gamma$  de la proteína G heterotrimérica interacciona con el receptor activado. Esto hace que la estabilidad del complejo receptor-proteína G dependa de la interacción de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta\gamma$  en el heterotrímero, contribuyendo la disociación del trímero a la pérdida de la afinidad de las subunidades por el receptor. Diversas regiones de la subunidad  $\alpha$  (extremos amino y carboxilo-terminales, regiones del dominio GTPasa que establecen interacciones con el anillo de guanina, (región switch II) y de la subunidad  $\beta$  (región carboxilo terminal) participan en el acoplamiento con el receptor (Hamm y col., 1988; Taylor y col., 1994; Rens-Domiano y Hamm, 1995).

El hecho de que un receptor pueda acoplarse con diversos tipos de proteínas G abre la posibilidad a la conducción de señales por parte de los agonistas (Garzón y col., 1994a), de forma que diferentes agonistas puedan dirigir a un receptor hacia la activación de unos tipos u otros de proteínas G.

Una consecuencia del acoplamiento receptor-proteína G/agonista-específico

es el hecho de que un mismo receptor puede mostrar un perfil farmacológico diferente según la ruta de segundos mensajeros que es considerada para estudiar el orden de eficacias de diversos agonistas (Spengler y col.,1993; Robb y col., 1994). Pese a esta diversidad de rutas posibles, una señal extracelular produce en la célula una respuesta específica, que va a depender de las señales que estén recibiendo en un momento determinado y de la maquinaria de transducción de que disponga la célula para procesar dichas señales.

### **3. Moduladores de la función de proteínas G**

Además de la identidad molecular de las proteínas que forman parte del sistema de transducción que determina las interacciones posibles entre ellas, existen otros aspectos claves para la interpretación de la señal extracelular y de la integración de una respuesta específica (Neer, 1995). Los niveles de proteínas que integran el sistema de transducción, su distribución subcelular y movilidad, son importantes para el funcionamiento de éste y condicionan la especificidad de las interacciones proteína-proteína (Neer y Clapham, 1988). Ciertas modificaciones de carácter reversible de las proteínas G pueden servir como mecanismo de regulación de su actividad de forma selectiva y así, de las rutas de señalización que median. La fosforilación de algunos tipos de subunidades  $G\alpha$  por PKC (Fields y Casey, 1995; Kozasa y Gilman, 1996), así como su palmitoilación (dependiente del estado de activación de las proteínas G) (Degtyarev y col., 1993; Mumby y col., 1994) constituyen mecanismos de regulación de la transducción de señales a través de determinadas proteínas G.

A nivel de cinética del proceso de transducción, la actividad GTPásica intrínseca de las distintas subunidades  $G\alpha$  es diferente, lo que da lugar a que las señales mediadas por algunas  $G\alpha$  se extingan más rápidamente que las mediadas por subunidades con cinética de hidrólisis de GTP más lenta. Esta cinética, además, puede ser modificada en algunos casos por la acción de otras proteínas intracelulares por diversos mecanismos. Así, las proteínas reguladoras de la señalización mediada por proteínas G (RGS), constituyen una familia de proteínas de gran diversidad funcional ligadas directamente a la activación de las subunidades  $G\alpha$ , actuando como proteínas con función GTPásica (GAP). En otros casos, la regulación es a nivel de los dímeros  $G\beta\gamma$  (calmodulina, fosducina) (Katada y col.,

1987; Leey col., 1992; Müller y col., 1996; Schülz y col., 1997). La fosducina, proteína citosólica de 33 kDa, regula la transmisión receptoral uniéndose al dímero  $\beta\gamma$  como detallaremos en uno de los puntos de este mismo apartado.

### **3.1 Interacción de RGS con proteínas G.**

RGS ó reguladores de la señal de proteínas G, constituyen una familia de proteínas de gran diversidad funcional con un dominio común de aproximadamente 120 aminoácidos (dominio RGS). Estos dominios RGS están ligados directamente a la activación de la GTPasa de las subunidades  $G\alpha$ , limitando el tiempo de vida media de unión de  $G\alpha$  con GTP (Hepler, 1999). En algunos casos, RGS unidas a las subunidades  $G\alpha$  puede inhibir competitivamente la interacción de  $G\alpha$  con el efector, lo cual indicaría que las proteínas RGS antagonizan a dicho efector (Hepler y col., 1997; Tesmer y col., 1997). Además, durante el tiempo que la subunidad  $G\alpha$  está unida a la proteína RGS no es posible la reagrupación del heterotrímero, lo cual reduce el número de proteína G que pueden ser reguladas por los receptores (Dohlman y col 1997; Dohlman. y col 1996)

Sólo un número determinado de posibles combinaciones de interacciones RGS- $G\alpha$  han sido analizadas. Como regla general, casi todos los miembros de la familia analizados que actúan como GAPs actúan selectivamente sobre uno ó más miembros de la familia  $G\alpha_i$  ( $G\alpha_{i1}$ ,  $G\alpha_{i2}$ ,  $G\alpha_{i3}$ ,  $G\alpha_o$ ,  $G\alpha_t$ ,  $G\alpha_z$ ) y/o  $G\alpha_q$ , y no sobre  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_{11-12}$ . La determinación de la estructura cristalográfica para el complejo RGS4 con  $G\alpha_{i1}$ -GDP-AIF4- revela que el dominio RGS forma un hélice de nueve bucles que contacta con  $G\alpha_i$  a tres niveles distintos (Tesmer y col., 1997). Dos residuos de superficie de  $G\alpha_{i1}$  (Thr182 y Gly183) parecen ser esenciales en la

afinidad de interacción  $G\alpha$ -RGS, aunque también existen otros residuos importantes (Tesmer, y col., 1997; DiBello, 1998).

La Thr de la posición 182 de  $G\alpha_i$  la conservan los miembros de las familias de  $G\alpha_i$  y  $G\alpha_q$  y no en  $G\alpha_s$  o  $G\alpha_{12}$ , y esto podría dar una clara explicación de las preferencias de RGS por la unión a  $G_i$  o  $G_q$ . Ciertos miembros de la familia presentan selectividad por solo un único miembro de  $G\alpha_o$   $G\alpha_q$ . RGSZ1 prefiere  $G\alpha_z$  (Wang y col., 1998; Glick y col., 1998), RGS11 prefiere  $G\alpha_o$  (Snow, 1998) y RGS2 prefiere  $G\alpha_q$  (Heximer, y col., 1997). Recientes datos experimentales sugieren que las proteínas RGS están envueltas en la regulación de funciones celulares moduladas por señalización a través de proteínas G, tales como tráfico de membrana, diferenciación celular, desarrollo embrionario y proliferación celular (De Vries y col., 1999).

### **3.2 Interacción fosducina-proteínas G**

Las proteínas G heterotriméricas se disocian tras la activación del receptor correspondiente en subunidades  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$  realizando diversas funciones que regulan la transmisión de señales (Gilman, 1987). Una característica común a la familia de receptores acoplados a las proteínas es la rápida reducción de la señal en respuesta a una estimulación prolongada, de forma que una dosis capaz de producir inicialmente un considerable efecto, se vuelve menos eficaz tras varios días de tratamiento. Este proceso de desensibilización se ha caracterizado principalmente a nivel de receptor (fosforilación por quinasas y unión de  $\beta$ -arrestinas) (Inglese, 1992; Lefkowitz y col., 1992; Miller y col., 2000; Pulvermuller y col., 2000; Vishnivetskiy y col., 2000). Recientemente, se han identificado una serie de proteínas intracelulares que interactúan con las proteínas G y regulan su señalización.

La fosducina es una de las proteínas que participa en la regulación de proteínas G. Esta proteína citosólica de 33 kDa cuya estructura cristalográfica ha sido ya descrita (Gaudet y col., 1996), se encuentra en altas concentraciones en retina (Lee y col., 1987) y forma complejos con el dímero  $G\beta\gamma$ . El estado de fosforilación de la fosducina, determina la magnitud de amplificación de la señal mediada por proteínas G (Wilkims y col., 1995). Fosducina defosforilada, secuestra  $G\beta\gamma$  y previene la activación del receptor. La unión de fosducina defosforilada, bloquea la interacción directa de  $G\beta\gamma$  y el efector enzimático (Hekman y col., 1994). Además se ha propuesto la existencia de unas proteínas homólogas, conocidas como *tipo fosducina* (PhLP), las cuales se expresarían en cerebro y otros tejidos (Danner y col., 1996; Wehmeyer y Schulz., 1997).

Las PhLPs son producto de lecturas alternativas de un único gen. De las diferentes variantes aisladas, dos formas de esta proteína: PhLP larga (PhLP) y PhLP corta (PhLPs), una forma truncada de PhLP que carecen de los 83 aminoácidos situados en el extremo N-terminal.

#### **4. Localización de las proteínas G en la bicapa lipídica**

En los últimos años el análisis de la estructura de la membrana celular ha puesto de manifiesto la existencia de regiones concretas en las cuales se acumulan

y ordenan una serie de lípidos y proteínas (Schroeder y col., 1994; Simon e Ikonen, 1997; Brown y col., 1998). Esta organización preferencial de esfingolípidos y colesterol trae como consecuencia la formación de unas estructuras que se comportan como plataformas móviles, a modo de balsa, dentro de la bicapa lipídica de la membrana, y que se conocen por el término inglés de *Arafts*<sup>®</sup>. Estos microdominios lipídicos estarían presentes de forma general en las células de mamíferos, incluirían de forma selectiva una serie de proteínas y actuarían como centros integradores de la maquinaria de señalización intracelular.

Es conocido que las membranas de las células epiteliales están polarizadas en dos dominios el apical y el basolateral, siendo el primero rico en esfingolípidos (glicoesfingolípidos y esfingomieline) y el segundo en fosfatidilcolina. En este sentido, se ha detectado un transporte de glicoesfingolípidos desde el Golgi al dominio apical, que incluyen también una serie de proteínas destinadas a localizarse en esta zona de la membrana (Simons y van Meer., 1988). Curiosamente, las caveolas que son pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática, presentes en un gran número de tipos celulares, contienen agregados de glicoesfingolípidos y necesitan la presencia de colesterol para su funcionamiento (Rothberg y col., 1990). Ya que las caveolas tienen un papel esencial en los procesos de endocitosis y transcitosis, es lógico asumir una función similar para los dominios *Arafts*<sup>®</sup> de la membrana (Dupree y col., 1993).

El modelo de organización propuesto para estas estructuras supone una asociación lateral de esfingolípidos con las moléculas de colesterol ocupando los espacios vacíos, además se incluirían otros fosfolípidos en la cara citoplasmática de la membrana, formando una estructura separada del resto de la bicapa lipídica.



Basándonos en este modelo, se ha postulado que las proteínas con alta afinidad por un determinado orden lipídico son selectivamente reclutadas en estos dominios rafts (Schroeder y col., 1998; Moffet y col., 2000) englobándose en este grupo a las proteínas G heterotriméricas y las Ras. Además, diferentes lípidos implicados en la transducción de señales, como los fosfoinosítidos, también se han localizado en estas estructuras (Simon e Ikonen., 1997).

El papel funcional asignado a las *Arafts*® en la señalización es la capacidad de concentrar receptores para facilitar la asociación con los ligandos y los correspondientes efectores en ambos lados de la membrana. Finalmente, es importante considerar que la asociación de las proteínas con estos dominios pueden ser moduladas por otras moléculas que favorecen su asociación o exclusión en estas estructuras.

En el caso concreto de las proteínas G se sabe que diferentes modificaciones lipídicas determinan su asociación a la membrana. Toda subunidad  $\alpha$  está modificada con ácidos grasos, grupos miristoilos, palmitoilos o ambos, mientras que las subunidades  $\gamma$ , por grupos farnesilo o geranil-geranilo (Wedegaertnan y col., 1995). Por tanto, se ha establecido un papel claro para las N-miristoilaciones y prenilaciones que median la asociación de proteínas G a membranas de células de mamíferos. Así, mutaciones en miembros de la familia  $G\alpha_i$  que conlleva la ausencia de N-miristoilaciones o de prenilaciones, son siempre citosólicas. Las palmitoilaciones de  $G\alpha$  parece que no son una causa que determine la unión a membrana, al menos en presencia de  $\beta\gamma$ , pero puede jugar un papel en la orientación específica de  $G\alpha$  a la membrana plasmática. La concentración y

distribución específica de ciertas proteínas en estos compartimentos, incrementa la eficiencia y especificidad de la señal de transducción al facilitar las interacciones apropiadas entre las proteínas, evitando al mismo tiempo, interferencias entre rutas no deseadas.

#### **4.1 Estructura de las caveolas**

Las caveolas son invaginaciones vesiculares de la membrana plasmática de 50-100 nm de diámetro con un papel importante en múltiples funciones celulares, entre las que se incluyen la transducción de señales, metabolismo lipídico, crecimiento celular y apoptosis. (Ikezu, y col., 1998). El componente mayoritario en la membrana caveolar es una proteína denominada caveolina. Esta proteína interacciona con moléculas asociadas a la transmisión de señales, como H-Ras, proteínas G heterotriméricas, factores de crecimiento epidermales, proteína quinasa C, Src, y óxido nítrico sintasa (NOS), (Couet, y col., 1997; García-Cardena, y col., 1997; Cameron, y col., 1997; Li, y col., 1996). Recientes evidencias sugieren que la caveolina puede funcionar como un eslabón para organizar y concentrar ciertas moléculas en las caveolas membranales.

Hasta ahora han sido identificados mediante clonación tres genes para caveolina: Cav-1, Cav-2 y Cav-3 (Glenney, 1992), y dos isoformas de Caveolina 1 (Cav-1 $\alpha$  y Cav-1 $\beta$ ) derivadas de lecturas alternativas del mismo gen durante la traslación. Caveolina 1 y 2 son más abundantes en adipocitos, células endoteliales y fibroblastos mientras que Caveolina 3 es específica de músculo. Estas proteínas interaccionan entre sí formando homo-oligómeros que a su vez interaccionan con glicoesfingolípidos de la membrana (Khurana, 1992), o bien unen directamente

colesterol formando hetero-oligómeros (Li, y col.,1996; Ulrich, y col., 1984).

Caveolina 1 fue el primer miembro de la familia que se identificó, y ha servido como prototipo para el estudio de las caveolinas y sus funciones. Es una proteína de 22-24 kDa constituida por 178 residuos aminoacídicos y que presenta una inusual topografía, un dominio central que contiene 33 aminoácidos hidrofóbicos (residuos 102-134) a través del cual forma una horquilla de unión con la membrana sirviendo de anclaje a la misma. Como consecuencia, el dominio N-terminal (residuos 1-101) y C-terminal (residuos 135-178) permanecen en el citoplasma y por tanto son accesibles para las interacciones proteína-proteína citoplasmáticas (Frangioni y Neel,1993). Una zona de 41 aminoácidos (61-101) del dominio N-terminal se encarga de formar los homo-oligómeros (Sargiacomo y col 1995), mientras que otra zona de 44 aminoácidos del dominio C-terminal actúa como puente que permite la unión de estos homo-oligómeros entre sí, formandose un ensamblaje rico en caveolina.

#### **4.2 Interacción caveolina-proteínas G heterotriméricas**

La caveolina interacciona directamente con la subunidad  $\alpha$  de las proteínas G (Okamoto y col., 1998). El lugar de unión está localizado en una zona de 41 aminoácidos del dominio N-terminal de la caveolina (residuos 61-101). La activación farmacológica o mutacional de  $G\alpha$  impide la co-purificación con caveolina 1, bloqueandose la interacción directa con caveolina 1 in vitro e indicando que es la *forma inactiva* de  $G\alpha$ , ( $G\alpha$ -GDP), la que interacciona preferencialmente con la caveolina 1 y que esta funciona, como una proteína **GDI** (inhibidor de la disociación de GDP). La correspondiente región de caveolina 2 es 30% idéntica a caveolina 1,

estimula la GTPásica de las proteínas G (Scherer 1996) actuando como **GAP** (proteína activadora de GTPasa). Por tanto, ambas actividades (GDI y GAP) van a retener o situar proteínas G en su forma inactiva, unida a GDP. Por último hay que mencionar que H-Ras interacciona también con caveolina 1 (Li y col., 1996; Song 1996). La zona de unión con la H-Ras fue localizada en una zona de 41 aminoácidos próxima a la membrana (61-101) del dominio N-terminal de la caveolina 1, la misma zona responsable de la interacción con la subunidad  $\alpha$  de las proteínas G.

## **5. Planteamiento y Objetivos**

El estudio del papel funcional desempeñado por las proteínas G en el inicio de la cascada de eventos que comienza con la activación de un receptor G por un agonista, ha sido uno de los objetivos prioritarios de la investigación desarrollada en el *Laboratorio de Neurofarmacología del Instituto de Neurobiología Santiago Ramón*

y *Cajal*, CSIC, durante la última década. Este grupo ha sido pionero en demostrar que la administración *in vivo* de agentes capaces de alterar el tono funcional de las proteínas G (toxinas pertúsica y colérica, N-etilmaleimida, Mastoparén,...) reduce, aunque de forma diferencial, el grado de eficacia de distintos agonistas opioides para producir analgesia supraespinal en el ratón. Posteriormente, mediante el empleo de herramientas mas selectivas, se ha comprobado que el bloqueo de la síntesis de algunos subtipos concretos de proteínas G, mediante la administración subcrónica por vía intracerebroventricular (i.c.v.) de oligodeoxinucleótidos antisentido (ODN) complementarios a secuencias específicas de los ARN mensajeros que codifican estas proteínas transductoras, da como resultado un descenso significativo de la analgesia inducida por distintas sustancias en el ratón, tanto opioides como no opioides (ver por ejemplo la revisión de Garzón y col., 2000). Esta disminución en su funcionalidad se correlaciona con una reducción entre un 20 y un 60%, en la inmunoreactividad  $G\alpha$  en áreas concretas del sistema nervioso central del ratón.

En esta misma línea, es esencial hacer mención que la administración *in vivo* de anticuerpos generados frente a secuencias específicas de las subunidades  $\alpha$  a ratones produce efectos similares a los ODNs (Sánchez-Blázquez y col., 1995). La especificidad de los resultados obtenidos en los estudios de analgesia se soporta sobre el hecho que tras la administración i.c.v. de  $^{125}\text{I}$ -IgGs frente a la subunidad  $G\alpha_{i2}$ , el análisis autorradiográfico reveló que las IgGs lograron marcar específicamente estas subunidades en diferentes áreas del cerebro del ratón (Sánchez-Blázquez y col., 1996; Garzón y col., 1999). Esta observación se ha visto confirmada mediante la utilización de técnicas de microcopia electrónica, en las que tras administrar i.c.v. anti- $G\alpha_{i2}$ -IgGs marcadas con oro coloidal de 6 nm, se pudo

observar su paso desde el espacio ventricular hacia el interior de las células del epéndimo, para luego pasar a las células neurales, lo que evidentemente no sucede cuando estas IgGs se inactivan, o el estudio se realiza con anticuerpos que no reconocen a las subunidades  $\alpha$  de las proteínas G (Garzón y col., 1999).

La selectividad de estos efectos nos lleva a considerar la posibilidad de que ciertas proteínas G, o al menos las subunidades  $G\alpha$ , en determinadas circunstancias pudiesen ser liberadas al líquido cerebro espinal (LCE) y que de aquí puedan ser captadas de nuevo por el tejido neural. Si este fuese el caso, las IgGs-anti $G\alpha$  reconocerían a sus correspondientes antígenos en el LCE, acompañándolas luego en su internalización celular. Los datos de analgesia nos revelan que anticuerpos privarian a estas  $G\alpha$  de su función fisiológica.

Esta propuesta, es decir la posibilidad de que las proteínas G presentasen una mayor movilidad de la actualmente asignada se sustenta en numerosos trabajos realizados por muy diversos grupos (Willard y col., 2000; Crouch y col., 1990, 1991 y 2000). Así, sabemos que aparte de su función más conocida regulando la actividad de enzimas y canales iónicos en respuesta a la estimulación del receptor por un agonista, las proteínas G participan en otros procesos como son la diferenciación celular (Shaefer y col., 2000), el transporte vesicular (Yoo y col., 1999; Holtje y col., 2000; Colombo y col., 1995) y en el crecimiento celular en la oncogénesis (Willard y Crouch, . Consecuentemente, no es sorprendente que las proteínas G se localicen tanto en la membrana plasmática, como también en diferentes membranas intracelulares. Diferentes tipos de proteínas G sensibles a la toxina pertúsica se han detectado en las membranas de gránulos secretores

(Toutant y col., 1987), retículo endoplásmico (Audigier y col., 1988; Codina y col., 1988), endosomas (Ali y col., 1989) y aparato de Golgi (Fries y col., 1980).

Así, dependiendo del tipo celular, la proteína  $G\alpha_{i3}$  se localiza exclusivamente en el aparato de Golgi o también en la membrana plasmática (Stow y col., 1991; Aridor y col., 1993). Wedegaertner y col. (1995) sugieren que los diferentes lípidos unidos a las proteínas las dirigen hacia membranas celulares únicas. Cambios en la localización subcelular de proteínas sobreexpresadas  $G\alpha_{i2}/G\alpha_{i3}$  en quimeras, sugieren que la información para dirigirse a su destino está en el extremo C-terminal de las subunidades  $\alpha$  (de Almeida y col., 1994). Esto concuerda con el descubrimiento de una  $G\alpha_{i2}$  con un *splicing* alternativo en la región C-terminal, el cual cambia su distribución celular de la membrana plasmática al complejo de Golgi (Montmayeur y col., 1994).

Por otra parte, existen evidencias de la asociación de las proteínas G con el citoesqueleto (Rasenick y col., 1990). Además, existen otras regiones subcelulares en las cuales se han identificado proteínas G, como son vesículas pinocitóticas, núcleo (Fishburn y col., 2000; Willard y col., 2000; Crouch y co., 2000), el huso mitótico (Chin-Tarn-Lin y col., 1992; Haraguchi y col., 1990) y vesículas recubiertas (Leyte y col., 1992; Helms y col., 1995; Fiscer y col., 1999). También participan en la coordinación e integración de información durante la función neural. Se ha demostrado que las proteínas G interaccionan con tubulina, colágeno y actina, y que la PTX bloquea algunas de esas interacciones (Simon, 1991). Es por tanto lógico asumir que la importancia fisiológica de las proteínas G es mas amplia de la considerada inicialmente y que pueden tener asignado algún papel aún por

describir. El presente trabajo se diseñó con un doble objetivo, en primer lugar analizar la posible existencia de una ruta fisiológica de internalización de las proteínas  $G\alpha$ , que sería en último término la responsable de la entrada de los anticuerpos por nosotros descrita, para posteriormente proceder a su caracterización. Como herramienta esencial para nuestro trabajo contamos con la disponibilidad de subunidades  $G\alpha$ -miristoiladas recombinantes (Graber y col., 1992, 1994). Se conoce que la unión covalente de ácidos grasos (miristato y/o palmitato) al extremo amino terminal de la subunidad  $\alpha$  de las proteínas G condiciona su interacción con la membrana plasmática y con otras proteínas bien sean los receptores o los efectores (Casey y col., 1994; Resh., 1994; Wedegaertner., 1995; Milligan ., 1995; Lambright., 1996). En este sentido, la subunidad  $\alpha$  de las proteínas  $G_i/G_o/G_x/z$  están miristoiladas (en una  $G_{li}$  del terminal amino), la miristoilación es un proceso, generalmente irreversible, que aumenta la afinidad de la subunidad  $\alpha$  por el complejo  $\beta\gamma$  y por los efectores, al tiempo que facilita la asociación de la subunidad  $\alpha$  a la membrana plasmática. Otras familias de proteínas G ( $G_s$  y  $G_q$ ) pueden ser palmitoiladas de forma reversible en la  $Cis-3$ , e incluso pueden darse ambas modificaciones en sitios separados (familia  $G_i$ ). Estas modificaciones lipídicas covalentes, favorecen la asociación de las proteínas G a la membrana plasmática, y parecen ser esenciales para que la proteína G sea funcional.

Los apartados concretos de estudio se centran en:

- 1.- Considerando que trabajos previos del Laboratorio de Neurofarmacología han confirmado la internalización neural de anticuerpos específicos frente a proteínas G marcados con fluorescencia, en el presente estudio pretendemos analizar la posible entrada y localización en SNC de ratón de proteínas recombinantes  $G\alpha$ -miristoiladas administradas *in vivo*.



2.- Paralelamente hemos procedido, mediante el empleo de técnicas de microscopia electrónica, al estudio ultraestructural de la internalización de estas subunidades, para así caracterizar la ruta específica empleada y el mecanismo responsable de su entrada.

3.- Una vez identificada la presencia de subunidades  $G\alpha$  administradas *in vivo* en estructuras internas de cerebro de ratón, realizar ensayos de funcionalidad con estas proteínas  $G\alpha$ -exógenas basados en la respuesta frente distintos agonistas, empleando para ello un modelo experimental de analgesia inducida en esta especie animal.

4.- Un estudio paralelo ha sido la caracterización del modelo de astrocitos en cultivo en cuanto su contenido de proteínas G. En este mismo modelo se ha estudiado mediante microscopía confocal, la internalización y los posibles mecanismos empleados en su entrada por distintas subunidades  $G\alpha$  administradas en el medio de cultivo.

5.- Finalmente, sobre estos cultivos primarios hemos evaluado el posible efecto mitogénico/proliferativo de las distintas subunidades  $G\alpha$ -exógenas.

## **1. Materiales**

### **1.1 Animales.**

En los estudios comportamentales se utilizaron ratones macho, variedad albina, cepa CD-1 (**CRIFFA**), de 22-27 g de peso y para cultivos primarios ratas raza Wistar de 250-300 g de peso, procedentes del animalario del Instituto Cajal. Todos los animales se mantuvieron en el estabulario en condiciones de agua y comida *ad libitum*, periodos de luz y oscuridad de 12 horas y temperatura ambiente de 22°C. En la estabulación y utilización de los animales se siguió la normativa vigente en la Unión Europea sobre uso y experimentación con animales de laboratorio.

### **1.2 Cultivos celulares**

La actividad, funcionalidad y especificidad en la división celular inducida por las diversas subunidades  $G\alpha$ , se midió utilizando cultivos de astrocitos y neuronas. Los medios de cultivo fueron adquiridos a **Life Technologies**, los antibióticos y poli-L-lisina a **Sigma**, el suero fetal bovino a **Gibco** y el material de plástico a **Costar** o **Falcon**.

#### **1.2.1 Cultivo de astrocitos**

Los cerebros de rata neonatal (P0-P1) se obtuvieron por decapitación y disección, separándose las meninges de los hemisferios cerebrales. Las cortezas, libres de meninges, se lavan con BME (EAGLE) suplementado con Glutamax, penicilina (20 IU/ml), estreptomicina (20 µg/ml), 33 mM de glucosa y suero fetal bovino al 10% (BME/F-10S) se hacen pasar a través de un filtro estéril de 135 µm, se centrifugan a 900 rpm durante 5 minutos y por último, tras recoger el pellet

obtenido y resuspenderle en BME/F-10S, se realiza un segundo filtrado, esta vez a través de un filtro de 20µm, separándose así vasos sanguíneos, agregados celulares y otros desechos que podrían interferir en la obtención de un cultivo puro. La suspensión de astrocitos de corteza se sembró en frascos de cultivo, manteniéndose en un incubador a 37°C, en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> saturada de vapor de agua. Una vez alcanzada la confluencia (8-10 días), los astrocitos se purificaron adicionalmente eliminando, mediante agitación orbital durante 12 horas a 37°C y cambio a medio fresco, las células de precursores O-2A y, parcialmente la microglía.

### **1.2.2 Cultivo de neuronas**

Partimos de cerebro embrionario de rata Wistar (E-15). Utilizando técnicas asépticas de disección, seleccionamos correctamente las cortezas de ambos hemisferios cerebrales libres de meninges. El tejido fue sometido a dispersión mecánica por repetición en HBSS-Balanced Salts w/o Calcium and Magnesium® (HBSS-***Life Technologies***) con Pasteur de diferente apertura de poro, evitando en todo momento turbulencias que pudieran dañar la integridad celular. Posteriormente se adiciona tripsina, dejando reposar la suspensión celular durante unos minutos en baño a 37°C neutralizando, inmediatamente después con BME (EAGLE) suplementado con Glutamax, penicilina (20 IU/ml), estreptomicina (20µg/ml), 33 mM de glucosa y suero fetal bovino al 10%. Se utilizó azul de tripano para observar la viabilidad de las células antes de la siembra sobre placas pre-tratadas con poli-L-lisina en una densidad de  $0,4 \times 10^6$  células por pocillo. Tras 2 horas de incubación en estufa a 37°C y atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>, se cambió a nuevo BME-penicilina/estreptomicina con suplemento N<sub>2</sub> el cual asegura el mantenimiento de

las neuronas en cultivo sin suero, según el método utilizado por Mazzori y Kenigsberg (1991). El suplemento N<sub>2</sub> está compuesto por glucosa (6g/l), insulina(10mg/l), transferrina (20 mg/l), putrescina (62 µM), progesterona (20nM), piruvato sódico (1mg/ml), carnitina (4mg/ml), selenito sódico (30nm) y ácido ascórbico (1mg/ml). Para suprimir el crecimiento de células gliales, a los cuatro días se trató el cultivo de neuronas con citosina-1-β-D arabinofuranósido (Dichter, 1978) 10 mM durante aproximadamente 72 horas. Transcurrido este periodo de tiempo se interrumpió este tratamiento, dejando crecer a las células en medio BME-N<sub>2</sub> /37°C/5% CO<sub>2</sub>.

### **1.3 Anticuerpos empleados en este estudio**

Para visualizar los cuerpos, dendritas y axones de las células neuronales se empleó, a una dilución 1:1000, el anticuerpo monoclonal SMI 32 de **Sternberger Monoclonals Inc**, el cual reacciona con el epítipo no fosforilado del neurofilamento H de las neuronas y no frente otras células del sistema nervioso central. Para la proteína ácida fibrilar específica de glía (GFAP), se empleó el anticuerpo monoclonal anti GFAP en una dilución 1:500, adquirido en **Sigma**. Ambos anticuerpos monoclonales fueron revelados mediante técnicas de inmunohistoquímica, con un anticuerpo secundario conjugado con los fluorófos Alexa Fluor 488 (absorbancia 495-emisión 519) y Alexa Fluor 594 (absorbancia 590-emisión 617) de **Molecular Probes, Inc**, empleados a una dilución 1:1000. Los anticuerpos policlonales específicos de caveolina, fueron adquiridos bien a **Transduction Laboratory**, generados frente a la secuencia FEDVIAEP, o bien a **Santa Cruz**, generado frente la secuencia amino-terminal de caveolina humana 1 (sc-894), o generado frente al epítipo correspondiente a los aminoácidos 82-178 de la secuencia carboxi-terminal (sc-7875), todos ellos empleados a una dilución 1:200.

Los reactivos empleados fueron de elevado grado de pureza, aptos para análisis. La firma comercial suministradora se detalla siempre que son citados por primera vez.

#### **1.4 Proteínas $G\alpha$ -miristoiladas y anticuerpos frente a proteínas G**

Las distintas proteínas recombinantes  $G\alpha$ -miristoiladas fueron adquiridas a **Calbiochem**, subunidades  $G\alpha_{i1}$  (371793-T),  $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas (371796-T), subunidades  $G\alpha_{i3}$ -miristoiladas (371799-T) y subunidades  $G\alpha_o$ -miristoiladas (371790-T), fueron administradas *in vivo* a distintas dosis e intervalos de tiempo según indicamos en el apartado de métodos.

Los anticuerpos utilizados en este trabajo frente a secuencias específicas de la subunidad  $\alpha$ , han sido generados y caracterizados en el laboratorio de Neurofarmacología del Instituto Cajal (Garzón y col., 1999). El empleo de anticuerpos policlonales es más aconsejable en este tipo de estudios, ya que facilita el reconocimiento de la secuencia antigénica en circunstancias en que ésta se encuentra integrada en la proteína nativa. Tras realizar un análisis comparativo de la secuencia aminoacídica de subunidades  $G\alpha$  deducida a partir de clones de ADNc de rata (Jones y Reed, 1987; Matsuoka y col., 1988) se seleccionaron los siguientes fragmentos como péptidos antigénicos:

$G\alpha_{i1}$ secuencia interna (118-124)	FMTAELA
$G\alpha_{i2}$ secuencia interna (115-125)	EEQGMLPEDLS
$G\alpha_{i0}$ secuencia interna (22-35)	NLKEDGISAAKDVK
$G\alpha_{i3}$ secuencia interna (93-102)	IDFGAARAD

La afinidad y especificidad de los sueros fue determinada por inmunodetección (Western blotting) sobre muestras sometidas a electroforesis en geles de SDS/PAGE y posteriormente transferidas a membranas capaces de retener las proteínas.

#### **1.4.1 Purificación de IgGs a partir de sueros inmunes**

Para purificar las IgGs frente a las distintas subunidades  $\alpha$  que se emplearon en los experimentos, a partir de sueros inmunes, se prepararon columnas de afinidad que contenían el péptido antigénico anclado a una matriz, de CNBr-Sepharosa 4B (**Pharmacia**). En el caso de sueros preinmunes, o cuando no fue posible disponer de la cantidad de péptido antigénico necesaria para la preparación de columnas de afinidad, se emplearon cartuchos de proteína A (Mem-Sep CAPA 100 01, **Millipore**) para la obtención de IgGs purificadas. En cada cromatografía se partió de aproximadamente 4 ml de suero crudo y el eluido IgGs fue sometido a diálisis/concentración en un sistema de Micro-Pro DiCom (**Spectrum**), para retención de moléculas con pesos moleculares superiores a 15.000. La concentración final de la proteína osciló entre 1,5 y 2,5 g/ml.

#### **1.5 Estudios de inmunodetección**

En muestras de preparaciones de células astrogiales sometidas a electroforesis en geles (SDS/PAGE) y posteriormente transferidas (Western blotting), se caracterizó la presencia de las subunidades  $\alpha$  de las distintas proteínas G con sueros específicos.

### **1.5.1 Preparación de astrocitos para SDS/PAGE.**

Cultivos confluentes de astrocitos se lavaron con PB 0,1 M pH 7,5 en frío para retirar los restos del medio de cultivo. Posteriormente se procedió a levantarlos cuidadosamente de la placa de cultivo manteniendo su integridad celular. Tras una centrifugación a 1000 rpm desechamos el sobrenadante y resuspendemos el pellet con solución tampón PB 0,1 M pH 7,5. Tras homogeneizar la muestra en teflón-vidrio, se trató con ADNasa I (**Boehringer**) a 10 $\mu$ g/ml 30 minutos a 41C, para romper los ácidos nucleicos que pueden interferir en la electroforesis. La concentración de proteína se determinó mediante el método de Lowry (Lowry y col., 1951) empleando como patrón albúmina sérica bovina (BSA).

### **1.5.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida.**

Los geles empleados constan de una zona superior de compactación de las muestras aplicadas (Astacking@) y una zona inferior de separación de las proteínas que integran la muestra (Arunning@). Para resolver subunidades G $\alpha$  se prepararon geles de 0,15x8x10 cm, en gradiente de poliacrilamida (10-20%). Los astrocitos preparados fueron solubilizados antes de ser sometidos a electroforesis. Se descongeló la proteína y se resuspendió, a una concentración de 2-4  $\mu$ g/ $\mu$ l, en tampón de solubilización de muestras para SDS/PAGE (TRIS 50 mM-HCl, pH 6,8, SDS 3%, glicerol 10%, 2- $\beta$ mercaptoetanol 3%, azul de bromofenol 0,005%), calentándose a 1001C, 5 min. Las muestras se cargaron en los geles (80  $\mu$ g de proteína/calle); igualmente, se cargaron en algunas calles estándares comerciales de proteínas precoloreadas de pesos moleculares conocidos que permitieron seguir el desarrollo de la electroforesis, estimar la eficacia de la transferencia y asignar pesos moleculares aparentes a las proteínas de interés. La electroforesis se llevó a

cabo a 41°C, en cubetas (**Hoefer** SE 280) que contenían tampón TRIS 25 mM, glicina 192mM, SDS 0,1%, pH 8,3. Durante la carrera se aplicó una intensidad de corriente de 20-35 mA por gel (fuente de alimentación ISCO 595).

### **1.5.3 Inmunotransferencia (Western blotting®).**

Tras la electroforesis, las proteínas del gel se transfirieron a membranas de difluorode polivilideno (PVDF) de 0,2 µm (Trans-blot, **BioRad**). La transferencia se llevó a cabo a 41°C en tampón ATowing®: TRIS 25mM, glicina 192 mM, SDS 0,04%, metanol 20%, pH 8,3 (cubetas Mini Trans-blot Electrophoretic Transfer Cell, **BioRad**), aplicándose un voltaje de 70 V (200-300 mA) durante 120 min. Previamente a la inmunodetección, se bloquearon los sitios libres en la membrana con proteínas de leche deshidratada y deslipidada (Blocker, **BioRad**) preparada al 5% en tampón TRIS-salino (TBS): TRIS 50 mM-HCl, pH 7,7, NaCl 500 mM. El bloqueo se realizó durante 2 horas, a 25°C.

Para caracterizar los antisueros generados se incubaron las membranas con distintas diluciones (1:300-1:30000) de los sueros (anticuerpos primarios) en tampón TRIS-tween-salino (TTBS: TRIS 50mM-HCl, pH 7,7, NaCl 500mM, tween-20 0,05% durante 12-24 horas, a 41°C (**Hoefer Dec Probe** P 150). Transcurrido el tiempo de incubación se retiraron los antisueros y después de lavar las membranas con tampón TTBS, éstas se incubaron con un antisuero secundario (de cabra, generado frente a secuencias comunes a las IgGs de conejo acoplado a la peroxidasa (goat anti-rabbit IgG H+L-HRP conjugate, **Biorad**).

Este antisuero comercial se empleó a una dilución 1:3000 en tampón TTBS y la incubación se llevó a cabo a 25°C durante 3 horas. Una vez retirado el antisuero



secundario y lavadas las membranas con TTBS, la inmunodetección se reveló empleando un sustrato de peroxidasa.

Los sueros anti-G $\alpha$ <sub>i1-3</sub> fueron ampliamente caracterizados en nuestro laboratorio. Estos sueros inmunoreaccionaron con proteínas de 39-41 kDa, en estructuras de S.N.C. de ratón y rata y han sido utilizados en nuestro departamento para identificar, tanto *in vitro* (actividad GTPásica) (Garzón y col., 1994a) como *in vivo* (analgesia supraespinal) (Sánchez-Blázquez y Garzón, 1993; Sánchez-Blázquez y col., 1993; Garzón y Sánchez-Blázquez, 1994), las subunidades G $\alpha$  movivizadas tras la activación de receptores opioides. En trabajos de autorradiografía, tras la inyección i.c.v. a ratones de IgGs purificadas por afinidad a partir de sueros anti-G $\alpha$  y marcadas con <sup>125</sup>I, se observó un marcaje específico en distintas áreas cerebrales (Sánchez-Blázquez, y col., 1996b).

En estudios de analgesia en ratones, los resultados obtenidos tras la administración i.c.v. de ODNs complementarios al ARNm que codifica para distintas subunidades G $\alpha$  coinciden con los obtenidos con sueros anti-G $\alpha$ , y confirman la especificidad y utilidad de éstos como herramientas de identificación de proteínas G (Sánchez-Blázquez, y col., 1995; Garzón y col., 1995b). Se ha comprobado la falta de reactividad cruzada de los sueros anti-G $\alpha$ , al disponer de subunidades G $\alpha$ i/o recombinantes (Calbiochem), procedentes de lisados de *E. coli* (Garzón y col., 1997).

### **1.6 Marcaje con fluorescencia de proteínas recombinantes *Gαi2*-miristoiladas e IgGs.**

Los grupos amino libres de las proteínas van a reaccionar con el ester de la 5 (6)-carboxifluoresceína-N-succinamida (FLUOS, **Boehringer Mannheim**), formando enlaces amida altamente estables, emitiendo fluorescencia. Para marcar las IgGs previamente purificadas se siguieron las instrucciones del fabricante, para lo cual se emplearon los siguientes compuestos:

- Solución tampón fosfato salino (PBS)
- FLUOS: reactivo responsable de la señal fluorescente.
- Dimetilsulfóxido (DMSO): solvente de FLUOS.
- Columnas Sephadex: para separar las IgGs-FLUOS del FLUOS que no reaccionó.

El protocolo de marcaje se inicia al hacer reaccionar la proteína con las moléculas de FLUOS, en proporción 1:10. Se mantiene en agitación y se incuba en solución tampón salina durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente, las proteínas marcadas deben separarse del FLUOS no unido, mediante columnas de Sephadex (**Pharmacia**). En todos los casos para el acoplamiento a FLUOS se ha partido de 5 µg de proteína recombinante *Gαi2*-miristoilada y de 12,5 µg de IgGs, recogiendo en 50 µl (concentración teórica 0,1 µg/µl y 0,25 µg/µl respectivamente).

### **1.7 Acoplamiento de proteínas recombinantes *Gαi2*-miristoiladas e IgGs a oro coloidal.**

El producto utilizado fue oro coloidal con un tamaño medio de partícula de 6 nm de diámetro, de la casa comercial **Aurion** (Holanda). El factor esencial para el éxito del acoplamiento con el oro es la determinación del punto isoeléctrico de la

proteína que será acoplada. Este valor, o aproximadamente, un valor de 0,5 unidades de pH por encima, es considerado como el pH óptimo para la preparación del conjugado de oro. Bajo esas condiciones, la carga de la red de proteína es cero o ligeramente negativa y, por tanto, se previene la agregación con las partículas de oro por la atracción por una carga determinante, mientras que las interacciones hidrofóbicas se mantienen.

Para determinar si la absorción ha tenido éxito, se añade un electrolito a la mezcla proteína/oro. Un cambio de color después de la adición indica que la estabilización es incompleta. La menor cantidad de proteína añadida a la solución de oro que previene el cambio de color es considerada como la cantidad estabilizadora. Las moléculas libres de proteína competirán con las moléculas de proteínas acopladas en una reacción inmunoquímica y es probable que la cinética de difusión y de unión esté a favor de las moléculas libres. El exceso de moléculas de proteína libres debe ser eliminado después de la preparación del conjugado de oro.

#### ***1.7.1 Determinación de la cantidad estabilizadora de proteínas requeridas para el acoplamiento a oro coloidal***

Se realizan diluciones lineales de la proteína, con solución tampón bórax 2mM hasta completar 25  $\mu$ l. Añadimos 250  $\mu$ l de oro a pH 9 a cada tubo, se agita y se deja 15 minutos a temperatura ambiente. Si fuera necesario, el pH se ajustaría a 9 con ácido ortofosfórico 0,2 M o con carbonato potásico 0,2M. Posteriormente se añaden 250 $\mu$ l de cloruro sódico al 10%, se agita y se deja 5 minutos a temperatura ambiente. Después se procede a medir la absorbancia a 580 nm.

Para el blanco seguimos el mismo procedimiento utilizando 25  $\mu$ l de solución

tamponada de borax, 250  $\mu$ l de oro a pH 9 y 250  $\mu$ l de cloruro sódico al 10%. Los valores obtenidos se pueden representar y el punto en el cual la curva aparece asintótica con respecto a la abscisa, indica la mínima cantidad de proteína necesaria en el acoplamiento.

### **1.7.2 Preparación del conjugado oro coloidal/proteína**

Después de conocer la mínima cantidad de proteína necesaria, preparamos el conjugado con oro mezclando 1 ml de oro con 100  $\mu$ l de la disolución que contiene en relación 1:10, la solución tampón de bórax y 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l en caso de la proteína recombinante G $\alpha$ -miristoilada, 0,25  $\mu$ g/ $\mu$ l para el acoplamiento de IgGs a oro de 6 nm y 0,33  $\mu$ g/ $\mu$ l en el caso de oro de 15 nm. La mezcla se deja reposar durante 10 minutos y se centrifuga en frío (4°C) durante 45 minutos a 45000 x g. Este procedimiento nos permite obtener un pellet que en parte es sólido y en parte es viscoso. La parte viscosa o flotante contiene el anticuerpo acoplado al oro en un volumen final de 50  $\mu$ l aproximadamente. El pellet contiene las partículas no estabilizadas y los agregados, mientras que las proteínas, no absorbidas permanecen en el sobrenadante. Finalmente, la parte que hemos recogido se fracciona y se inyecta a los ratones vía i.c.v.

### **1.8 Oligodeoxinucleótidos antisentido: diseño y síntesis**

La administración *in vivo* de ODNs ha demostrado ser eficaz para reducir la síntesis de determinadas proteínas. En la actualidad no se conoce de forma precisa el mecanismo por el cual los ODNs penetran en las células, aunque parece intervenir un proceso de endocitosis de fase fluída, la pinocitosis, dependiente de la proteína quinasa C (Wahlesstedt, 1994). Una vez en el interior celular, los ODNs inducen sus efectos interfiriendo en la traducción o desestabilizando el ARNm. Los

oligodeoxinucleótidos utilizados en nuestro estudio fueron sintetizados en el Servicio de Macromoléculas del Instituto Cajal: el ODN-G<sub>i2</sub> $\alpha$  corresponde a la secuencia de nucleótidos 5'-A \* T\* GGTCAGAGCCCAGAGCCTCCGGATGACGC CC\*G\*A-3', (Sánchez-Blázquez y col.,1995, 1997; Garzón y Sánchez-Blázquez, 1998). Un ODN random con la siguiente secuencia 5'-C\*C\*CTTATTTACTACT TTC\*G\*C3' sirvió como control (Gillardon y col.,1994; Sánchez-Blázquez y col., 1995): el ODN  $\mu_{16-32}$  5'- C\*T\*GATGTTCCCTGGG\*C\*C-3': el ODN-CAVEOLINA corresponde a la secuencia 5'G\*C\*AATCACATCTTC\*A\*A3'. Los ODNs fueron elaborados en un sintetizador de DNA CODER 300 siguiendo la química de fosforoamidita (Mateucci y Caruthers, 1981). La síntesis ocurre desde el extremo 3' al 5', en la dirección opuesta a la reacción enzimática de polimerización 5'  $\rightarrow$  3' *in vivo*. Se protegieron los extremos con grupos fosforotioato (\*) para evitar su degradación por acción de exonucleasas. La introducción de los enlaces de fosforotioato se consiguió por sulfuración con tetraetiltiuram disulfide (Vu y Hirschbein, 1991). El crudo de ODNs fue purificado por cromatografía en fase inversa usando cartuchos COP (**Cruachem**). Los ODNs eluidos en 50% acetonitrilo-agua fueron liofilizados (Rouan RC 1009/RCT90)

## **2. Métodos**

### ***2.1 Microscopía de fluorescencia***

Para la observación al microscopio de fluorescencia AXIOVERT 35 (ZEISS) se procedió a administrar a dos grupos de ratones distintos 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de IgGs anti- $\text{G}\alpha_{i2}$ -FLUOS o 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de la proteína recombinante  $\text{G}\alpha_{i2}$ -miristoiladas marcada con una sonda fluorescente; la administración se realizó vía i.c.v. a ratones ligeramente anestesiados en un volumen final de 4  $\mu\text{l}$ . Las inyecciones se hicieron en el ventrículo lateral derecho con una jeringa Hamilton de 10  $\mu\text{l}$  a una profundidad de 3mm y en un punto que dista 2 mm hacia la zona lateral y 2 mm hacia la zona caudal de la bregma, a una velocidad de 1  $\mu\text{l}$  cada 5 segundos.

Posteriormente, se procedió al sacrificio de los animales por decapitación. Los cerebros deben obtenerse de forma que el intervalo postmortem sea mínimo, procediendo, inmediatamente después de ser extraídos, a la congelación en hielo seco y posterior almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de obtener las secciones.

Los cerebros incluidos en ATissue-teck®, fueron cortados en secciones coronales de 20  $\mu\text{m}$  de grosor en criostato a  $-22^{\circ}\text{C}$ , según el atlas anatómico Paxino y Franklin (1982), recogiendo los cortes sobre portas previamente tratados con una mezcla de gelatina (0,5%) y sulfato potásico crómico, con el fin de evitar que los cortes de los tejidos se desprendan. Además del espesor del corte y la temperatura, otros factores que determinan la calidad y la facilidad en la obtención de las secciones son el ángulo de corte de la cuchilla y el funcionamiento de los dispositivos antienrollamiento. Existe cierta controversia sobre la temperatura

ideal para almacenar las secciones (Herkenham, 1988) y el periodo durante el cual pueden permanecer sin que exista detrimento de las propiedades, aunque se acepta que el almacenamiento a -201C es suficiente para una correcta conservación durante meses. Las preparaciones en estas condiciones de montaje pueden observarse directamente al microscopio de fluorescencia.

## ***2.2 Microscopía confocal***

### ***2.2.1 Fundamentos de la microscopía confocal.***

Los microscopios confocales diseñados por Minsky (1957) consiguen elevada resolución en un plano seleccionado merced a tres procesos fundamentales. En el primero, se enfoca mediante una lente objetivo, creando un haz biconico cuyo vértice o foco ilumina una zona de la muestra, a la profundidad deseada. A continuación, la luz reflejada por ese área es enfocada y concentrada en un punto, permitiéndole que pase en su totalidad a través de la abertura de una máscara situada frente a un dispositivo detector.

Las regiones opacas que rodean al orificio de filtrado cierran el paso a los rayos reflejados por las regiones suprayacentes e infrayacentes del plano de interés. Por último, la luz se traslada de una zona a otra hasta explorar el plano por completo. Para acelerar el barrido, se incorpora un disco provisto de cientos de finos orificios, a través de los cuales se envía y recoge la luz.

### ***2.2.2 Procesamiento de muestras para la observación en el microscopio confocal***

Cortes adyacentes a los utilizados en el apartado anterior se examinaron con el microscopio confocal (LEICA TCS 4D) equipado con un láser argón/criptón con un pico de excitación de 488nm, obteniéndose imágenes de alta resolución cuya información puede ser cuantificada mediante histogramas y analizada posteriormente con un sistema de tratamiento de imágenes.

Los cortes empleados en este estudio corresponden a colecciones paralelas de secciones coronales de 20  $\mu\text{m}$ , obtenidas a partir de cerebros de los mismos animales examinados con el microscopio de fluorescencia. El procesamiento de las muestras es exactamente igual al descrito en el punto 2.1 de Métodos, si bien para favorecer la observación en el confocal se requiere que sobre estos cortes, una vez recogidos en los portas gelatinizados, se deposite unas gotas de tampón fosfato/glicerol al 50%, protegiéndose todo ello con un cubreobjetos y cuidando que no quede entre la película oleosa y el cristal ninguna burbuja de aire que pudiera entorpecer el estudio.

### ***2.3 Procesamiento de muestras para microscopía electrónica.***

Los problemas más importantes de esta técnica son los que derivan de la necesidad de emplear especímenes lo más delgados posible, debido a dos motivos fundamentales: i) la escasa penetración de los electrones, ii) la gran profundidad de foco del microscopio. Si el objeto es muy grueso, aún cuando sea atravesado por muchos haces electrónicos, muchos de sus planos resultaran igualmente



enfocados. La técnica más empleada en el estudio de la ultraestructura celular, es la de los cortes ultramicrotómicos, la cual se inicia, con el proceso de fijación mediante perfusión vascular.

### **2.3.1 Características del proceso de fijación**

Consiste en someter al objeto a unos procesos que permitan conservar indefinidamente las estructuras finas en unas condiciones muy semejantes a las que poseían *in vivo*. Los fijadores químicos empleados en microscopía electrónica son sustancias que reaccionan con los radicales de las moléculas orgánicas proporcionándoles con ello suficiente estabilidad química y cohesión física. Las características de las sustancias fijadoras empleadas en microscopía electrónica dependen de unas propiedades fundamentales:

- *isotonía* con el tejido para evitar que un choque osmótico conduzca a una deshidratación o rotura del tejido.
- *velocidad de penetración* en el tejido para limitar el tiempo de intervalo entre obtención y fijación del tejido.
- *pH constante* durante todo el tiempo de fijación para evitar la precipitación de diversos componentes del tejido.

Los principales fijadores empleados en microscopía electrónica son :

*Tetróxido de Osmio (OsO<sub>4</sub>)*: fija correctamente los ácidos grasos, fosfolípidos, lipoproteínas y determinados grupos de las proteínas como son el triptófano y la histidina, mientras que no reacciona con los ácidos nucleicos.

*Aldehídos*: preserva proteínas y nucleoproteínas, tiene buena penetrabilidad en los tejidos y no desvirtúan a los enzimas. Parece ser que su acción sobre las proteínas es la de formar puentes metilénicos que unen las cadenas polipeptídicas.

*Paraformaldehído y glutaraldehído* son los fijadores más empleados. En general,

conviene que la acción de los aldehídos vaya seguida de un tratamiento posterior con  $\text{OsO}_4$ , ya que los aldehídos no proporcionan contraste a las imágenes de las estructuras por ellos fijadas y además, no fijan los lípidos ni los fosfolípidos y estos podrían ser extraídos durante el proceso.

### ***2.3.2 Perfusión vascular***

Los animales se anestesiaron profundamente con pentobarbital por vía intraperitoneal y se perfundieron a través de la aorta ascendente con una solución fijadora de paraformaldehído al 1%, glutaraldehído al 1% en tampón fosfato 0,1M a pH=7,5. La perfusión se realizó a presión constante gracias a una bomba peristáltica, utilizando 300 ml de fijador por ratón. Previamente al fijador, se pasaron 50 ml de solución salina tamponada (PBS) a pH 7,5 para arrastrar la mayor cantidad posible de células del torrente sanguíneo.

Tras la perfusión, los cerebros se post-fijaron en el mismo líquido fijador durante toda la noche. Al día siguiente, los cerebros se sometieron a dos lavados en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,5 y dos lavados más en agua destilada, siendo el tiempo de cada lavado de 10 minutos. A continuación, los cerebros se introdujeron en una solución crioprotectora de sacarosa al 25% en tampón fosfato 0,1 M pH 7,5 a 4°C, hasta que se hundan totalmente. Posteriormente, se procedió a su congelación a -20°C. Una vez estuvieron congelados, se obtuvieron con criostato cortes de 100µm de espesor y se procedió a la inclusión en araldita.

***\*Tinción Nissl***

Con el fin de elegir los cortes más adecuados, así como para comprobar la inocuidad de la inyección i.c.v. en el estado del tejido, procedimos a realizar una tinción de Nissl en secciones coronales de 100µm de distintos niveles respecto al punto bregma, obtenidas mediante vibrátomo, de cerebros de ratones tratados y perfundidos como hemos detallado en el apartado anterior. El método consta de los siguientes pasos:

- \* Mantener durante 1-2 horas en cloroformo-alcohol 1001 (1:1)
- \* Alcohol 1001 durante 3 minutos
- \* Alcohol 961 durante 3 minutos
- \* Alcohol 701 durante 3 minutos
- \* Alcohol 501 durante 3 minutos
- \* Agua destilada 3 minutos
- \* Tionina ácida a pH 4.5 durante 5 minutos. Este es el colorante y está formado por: 60 cc de solución B (6 cc de ácido acético glacial y 1000 cc de agua destilada), 40 cc de solución C (13,6 g de acetato sódico cristalizado y 1000 cc de agua destilada) y 4 cc de solución A (1 g de tionina en polvo y 1000 cc de agua destilada)
- \* Pasar por agua destilada
- \* Alcohol 501 durante 3-5 minutos
- \* Alcohol 701 durante 3-5 minutos
- \* Alcohol 961 durante 3-5 minutos
- \* Alcohol 1001 durante 3-5 minutos, dos veces
- \* Xilol durante 3-5 minutos, dos veces

Montar en portas gelatinizados con DePeX (***BDH Laboratories***).

### **2.3.3 Inclusión**

Las estructuras deben incluirse en una resina plástica especial (araldita), a fin de conferir suficiente resistencia y rigidez mecánica en el momento que se corten las secciones ultrafinas.

Para ello, una vez fijada y lavada la sección, se procede a la deshidratación completa mediante el paso por una serie gradual de alcoholes etílicos (70%, 96%, dos pasos en alcohol absoluto y dos últimos pasos en acetona pura). Cada una de estas etapas no debe durar más de 10 minutos y puede hacerse a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se introducen en una mezcla araldita/acetona (1:1) durante una hora. La composición de la resina araldita es :

*Monómero:* (resina epoxi) 10 gr de araldita 502 resin (**TAAB**)

*Endurecedor:* (anhídrido de un ácido dicarboxílico con cadena lateral alifática)

8 gr de DDSA (**TAAB**)

*Acelerador:* (derivado fenólico con grupo amino) 0,3 ml de DBP (**TAAB**)

*Plastificante:* (ftalato de butilo) 0,5 ml de BDMA (**TAAB**).

A continuación, los cortes se sumergieron en araldita pura y se guardaron toda la noche. Al día siguiente, se preparó nueva araldita en la cual se introdujeron las muestras durante 3-4 horas, esta vez a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, los cortes se montaron en portas y cubreobjetos siliconizados, con siliconas distintas para poder separarlos posteriormente, y se procedió a polimerizarlos en una estufa a 60°C durante 48 horas. para así abreviar esta fase. En los portaobjetos se utilizó silicona comercial **Serva** y en los cubreobjetos silicona comercial **Sigma**.

#### **2.3.4 Obtención de cortes ultrafinos en el ultramicrotomo:**

Tras la polimerización, se procedió a retirar el cubreobjetos de la preparación y se observó al microscopio óptico para seleccionar las áreas de estudio. La zona elegida incluida en la resina, se separó del portaobjetos y se depositó sobre un bloque de araldita polimerizada en el que se pone una gota de adhesivo cianocrílico en su superficie, quedando así el corte adherido y listo para ser retallado. Para ello, se utiliza una cuchilla de vidrio tallada por el propio microtomista, cortando láminas de 5 a 8 mm de grueso de manera que se forme un filo con un ángulo de 45°. Antes de colocar el bloque en el ultramicrotomo debe procederse a la operación de piramidarlo (recortarlo de forma tal que la cuchilla solo corte una mínima parte y lo haga según el plano que interese). Esta operación se hace fijando el bloque y tallándolo con gran cuidado con una cuchilla de afeitar, para darle forma de una pirámide truncada de base trapezoidal. Los bloques se cortaron en un ultramicrotomo Reichert-Jung ULTRACUTE, con un espesor de 1-2 micras, obteniéndose así los cortes semifinos.

Seguidamente, estos cortes se depositaron en portaobjetos y se tiñeron con azul de toluidina-borax. Tras ser observados al microscopio óptico, se seleccionaron las zonas de interés y se efectuó seguidamente los cortes ultrafinos con un ultramicrotomo Reichert-Jung ULTRACUTE a 70 nm recogiendo dichos cortes sobre rejillas cubiertas con una membrana de Formvar. Los cortes ultramicrotómicos se recogen por flotación en agua destilada contenida en un pequeño recipiente adosado a la cuchilla convenientemente, sobre las rejillas ya preparadas e invertidas. Los cortes ultrafinos quedan inmediatamente adheridos.

Luego se colocan estas rejillas sobre un papel de filtro y una vez secas

quedan listas para su observación al microscopio electrónico. Finalmente, los cortes se observaron con un microscopio JEOL 1200EXII a 80 KV.

### **2.3.5 Tinción de las rejillas.**

Todos los reactivos deben prepararse con 24 horas de antelación y se mantendrán en frío hasta su uso.

Acetato de uranilo:  $(\text{CH}_3\text{-COO})_2\text{UO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

H <sub>2</sub> O destilada	25 ml
acetato de uranilo dihidratado	0,5 gr

Nitrato de Plomo:  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$

H <sub>2</sub> O destilada y desgasificada	30 ml
Nitrato de Plomo	1,33 gr
Citrato sódico $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,76 gr
Dejar reposar 5 minutos	
NaOH	8 ml
H <sub>2</sub> O destilada desgasificada hasta	50 ml

Se colocan las rejillas en el porta-rejillas de goma sobre una gota de acetato de uranilo previamente filtrado y se mantiene en la oscuridad durante 1 hora. Posteriormente se efectúan tres lavados con agua destilada y se procede a pasar las rejillas a otra gota de nitrato de plomo en un recipiente o placa de Petri que contenga unas lentejas de NaOH, consiguiéndose así una atmósfera saturada NaOH, la cual evita la formación del precipitado de carbonato de plomo que entorpece la observación de los cortes en el microscopio. Por último se lavan las rejillas nuevamente con abundante agua destilada y se dejan secar.

### **3. Estudios de actividad biológica**

#### **3.1 Administración intracerebroventricular:**

La estabulación y utilización de los animales se realizó siguiendo estrictamente la normativa vigente en la Unión Europea sobre el uso y experimentación con animales de laboratorio (Council Directive 86/609/EEC).

Todas las administraciones i.c.v se realizaron en un volumen final de 4  $\mu$ l, unilateralmente (ventrículo lateral derecho), en animales ligeramente anestesiados con éter, empleando una jeringa Hamilton de 10  $\mu$ l a una profundidad de 3 mm y en un punto que dista 2 mm hacia la zona lateral y 2 mm hacia la zona caudal de la Bregma, a una velocidad de 1  $\mu$ l cada 5 segundos. Es importante señalar, que pruebas habituales en screening farmacológicos no registran cambios en la conducta de los animales inyectados con una única dosis (0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l) de proteínas recombinantes, o de IgGs (0,25  $\mu$ g/ $\mu$ l) purificadas por afinidad a partir de sueros frente a subunidades G $\alpha$ .

##### **3.1.1 Administración de PTX**

Estudios previos han mostrados que la administración i.c.v. de la toxina pertúsica (que cataliza *in vitro* la ADP ribosilación de la G $\alpha_i$  y G $\alpha_o$ , Hildebrandt y col, 1983) reduce la antinocicepción mediada por los receptores  $\mu$  del cerebro (Parenti y col., 1986) y médula espinal (Przewloki y col., 1987) de rata. Este tratamiento, también reduce la analgesia mediada por receptores opioides  $\mu$  y  $\delta$  en el ratón (Sánchez-Blázquez y Garzón, 1988, 1993).

El protocolo de administración que se ha seguido en el presente estudio es el siguiente; 0,5 µg/ratón de la toxina en 4 µl de agua, fueron administrados i.c.v. a un grupo de 15-20 ratones, según la técnica descrita en el apartado anterior. Al sexto día de este tratamiento se procedió a medir el efecto analgésico de los agonista empleados en este estudio o bien a recoger las muestras para seguidamente procesarlas según los protocolos requeridos para microscopía confocal.

### **3.1.2 Administración de oligodeoxinucleótidos antisentido.**

Para reducir la expresión de proteínas implicadas en la señalización, hemos administrado *in vivo* oligodeoxinucleótidos antisentido dirigidos al ARNm que codifica su síntesis.

Para medir la especificidad del tratamiento con ODNs se diseñaron tres grupos de animales control que fueron incluídos en todos los experimentos: un grupo de animales no inyectados, otro al que se administró i.c.v. el vehículo (suero salino), y animales inyectados i.c.v. con el random (ODN-RD). El resto de los animales recibieron el tratamiento con uno de los ODNs frente a la subunidad  $G\alpha_{i2}$ , o frente al receptor opioide  $\mu$ .

Las soluciones de ODNs fueron hechas en un volumen apropiado de agua estéril inmediatamente antes de su uso y administradas i.c.v. Para minimizar la posibilidad de que repetidas inyecciones i.c.v. originen neurotoxicidad, las administraciones de los ODNs fueron hechas en un intervalo de 24h (Chiasson y col., 1994).

El tratamiento con cada oligodeoxinucleótidos fue hecho en un grupo distinto



de 15-20 ratones usando el siguiente patrón: el 1<sup>er</sup> y 21 día con 1nmol, los días 3 y 4 con 2 nmol y el 51 día con 3 nmol. Al 61 día fueron inyectados i.c.v. los opioides agonistas y sus actividades antinociceptivas fueron evaluadas por el test del tail-flick. Para el estudio *in vitro*, tras el tratamiento con los diferentes ODNs, se procesaron los cerebros de estos animales para microscopía electrónica.

### **3.2 Valoración del efecto analgésico evocado por opioides.**

En los ensayos de analgesia, la antinocicepción se midió 30 minutos después de la administración i.c.v de los agonistas morfina (**Merck**),  $\beta$ -endorfina, y clonidina (**Sigma**), o 15 minutos después de la administración de DPDPE (**Península Labs**).

Para evaluar el efecto antinociceptivo supraespinal producido en ratones, se utilizó el test de "tail-flick" realizado según la técnica descrita por Nott (1968). Para ello, se introducen dos tercios de la cola del ratón en una cubeta con agua termostatzada a 52°C y se mide el tiempo (en segundos) que el animal tarda en retirarla, con un enérgico coletazo o sacudida corporal.

Los tiempos de latencia, en segundos, se miden antes, latencia basal (LB), y a diferentes intervalos después de la administración de morfina, latencia del test (LT). Se seleccionó un tiempo de corte de 10 segundos para no producir daño tisular al animal y la actividad antinociceptiva se expresó como un porcentaje del efecto analgésico máximo, (% M.E.P.). Se utilizó la siguiente ecuación.  $\%M.E.P = 100 \times (LT - LB)/(10 - LB)$ .

## **4. Estudios sobre cultivos celulares**

Como extensión del estudio expuesto anteriormente, hemos querido caracterizar el comportamiento de células específicas del Sistema Nervioso Central tras la administración exógena de las distintas  $G\alpha$  sensibles a toxina pertúsica. Para ello, hemos empleado cultivos celulares obtenidos según indicamos en el apartado 1.2 de Materiales, incubados en presencia de varios subtipos de  $G\alpha$  ( $G\alpha_{i2}$ ,  $G\alpha_{i1}$ ,  $G\alpha_{i3}$  y  $G\alpha_o$ ), centrándonos fundamentalmente en el análisis tanto del mecanismo de entrada y funcionalidad de estas proteínas, como en los posibles factores que podrían estar implicados en estos procesos.

La metodología que hemos empleado en este estudio, corresponde fundamentalmente a técnicas inmunocitoquímicas con anticuerpos monoclonales (GFAP, SMI-32) o policlonales (anti- $G\alpha$ , anti-caveolina...) revelados con diversos fluoróforos (cianinas, Texas Red, Alexas-FLUOR 488 y 549). En todos los casos el estudio se completó con la observación de las muestras en el microscopio confocal (LEICA TCS 4D), empleando para tomas generales de la población celular el objetivo 40, y para las magnificaciones y detalles objetivos 63 y 100.

Los protocolos completos, especificidad de cada anticuerpo, tiempos de incubación y cantidades administradas, se detallan puntualmente en cada uno de los experimentos correspondientes.

#### ***4.1 Ensayos de inmunofluorescencia***

Los cultivos de astrocitos obtenidos de corteza de rata postnatal (P0) fueron preparados como indicamos en el apartado 1.2 de Materiales y siguiendo el protocolo establecido por McCarthy y Vellis (1980). Tras alcanzar la confluencia, la monocapa celular fue tripsinizada y plaqueada en cubres de 10mm tratados con poli-L-lisina (1,5 µg/ml). Al cabo de 24 horas se disminuyó el contenido de suero en el medio hasta el 1% durante 12 horas para conseguir que todas las células estuviesen sincronizadas antes de comenzar los tratamientos.

En la primera parte de nuestro estudio se siguieron dos protocolos distintos, uno en el que los astrocitos se incubaron con las distintas subunidades G $\alpha$ -FLUOS a distintos intervalos de tiempo: 15 min, 30 min, 1 hora, 2.5 horas y 12 horas. Otro grupo se obtuvo para el tratamiento de astrocitos con 3, 10, 25 y 50 pm/100µl durante 24 horas. Transcurridos los distintos tiempos señalados para la incubación, se procedió a lavar las células con PB 0,1M para retirar los restos del medio de cultivo y de los tratamientos para posteriormente proceder a su fijación con 4% paraformaldehído. Posteriormente fueron montadas con glicerol-PB al 50 % para mejorar la calidad de observación en el microscopio confocal.

Posteriormente diseñamos protocolos específicos con el propósito de establecer la implicación de las caveolas en el mecanismo de entrada de estas proteínas en las células gliales y/o la posible variación de dicha entrada de G $\alpha$ i2-miristoiladas cuando las células reciben tratamientos con compuestos que alteran la endocitosis.

Otro punto de estudio fue las variaciones que introducían los tratamientos con

compuestos que inhiben PKC o PKA como detallamos a continuación.

#### **4.1.1 Cambios en el patrón de internalización de $\alpha$ <sub>i2</sub>-miristoilada tras modificar los procesos de endocitosis**

Las células fueron tratadas durante 7 horas con el macrólido **filipin III** (5µg/ml), o con glucósido cardiotónico **digitonina** (5µg/ml), ambos compuestos son capaces de unirse al colesterol, desplazándolo de la membrana, disminuyendo la densidad de la misma causando la desorganización de las caveolas y alterando por tanto el proceso de endocitosis. A otro grupo de células se las sometió al tratamiento con **colchicina** (1,5 µg/ml) y **nocodazol** (1,5µg/ml), ambos compuestos unen tubulina, previenen la mitosis y disminuyen la endocitosis por procesos independientes a la alteración del colesterol de membrana. Como controles se emplearon astrocitos tratados con **polimixina B** (50 µg/ml) capaz de interactuar con lípidos de la membrana pero sin alterar el colesterol (Bradley y col., 1980) al igual que **β-ciclodextrina** al 2% y **pentobarbital** (2,5 µM).

Transcurrido el periodo establecido para el tratamiento, se adicionaron las subunidades G $\alpha$ <sub>i2</sub>-miristoiladas (0,1 µg/µl) marcadas con FLUOS y se incubaron durante toda la noche a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Las células fueron posteriormente lavadas con PB 0,1 M, fijadas en 4 % de paraformaldehído y selladas con glicerol- PB 0,1M al 50% para su posterior observación al microscopio confocal.

#### **4.1.2 Inhibición de PKC/PKA**

De la misma forma que en el caso anterior, los astrocitos plaqueados sobre cubres de 10 mm de diámetro pretratados con poli-L-lisina (1,5 mg/ml) fueron tratados esta vez con **H7** (1 nM) que inhibe PKC $\rightarrow$ PKA, **H8** (1nM) inhibidor de PKA $\rightarrow$ PKC, **cheleritrina** (1 nM) y **monensina** (1 nM) inhibidores de PKC. De la misma forma, a las 7 horas del tratamiento con los distintos compuestos, los astrocitos fueron incubados con las subunidades G $\alpha_{i2}$ -miristoiladas (0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l) a 37 $^{\circ}$ C y 5% de CO $_2$  durante toda la noche. Posteriormente, las células se lavaron en PB 0,1 M, se fijaron en 4% paraformaldehído durante 10 minutos y se montaron en glicerol-PB para su observación al microscopio confocal.

#### **4.2 Administración de ODNs a cultivos de astrocitos**

Tras alcanzar la confluencia celular (8-10 días de cultivo en BME/F-10S), los astrocitos se tripsinizaron para separarles del sustrato y se replaquearon en una densidad de 3,5 x 10 $^3$  células/pocillo (12 pocillos), BME/F-10S durante 24 horas. Posteriormente, se procedió a administrar 2 $\mu$ M de ODNs en BME/F-1S durante 24 horas, repitiéndose este mismo tratamiento durante tres días consecutivos previo lavado y suplemento de medio fresco; Transcurrido este intervalo de tiempo las células fueron fijadas en 4% paraformaldehído durante 15 min para su posterior tratamiento inmunocitoquímico. Para este estudio se han empleado ODNs dirigidos al ARNm que codifica a la proteína G $\alpha_{i2}$ , y el ODNs dirigido a la caveolina, componente fundamental de las caveolas; como control en ambos casos se ha utilizado un oligodeoxinucleótido antisentido de secuencia aleatoria (ODN-RD) que se sabe no interfiere con la síntesis de estas proteínas.

#### **4.3 Inmunocitoquímica.**

Las células se cultivaron en BME/F-10S, sobre placas cubreobjetos de vidrio, previamente recubiertas de poli-L-lisina. Posteriormente se sustituyó el medio por otro similar con suero al 1%, conteniendo las distintas fracciones a ensayar y se incubaron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> durante el tiempo indicado en cada caso .

Para la detección de la proteína ácida fibrilar de glía (GFAP), las células tras los distintos tratamientos, se lavaron con PBS y se fijaron con 4% paraformaldehído, durante 15 minutos. Posteriormente, se incubaron los cultivos fijados, durante 1 hora y a temperatura ambiente, con una dilución 1/500 de GFAP ó en el caso de neuronas, anti-neurofilamentos (SMI-32) (anticuerpo monoclonal de **Boehringer**) en 0,1% de Tritón en PB. Para bloquear los lugares inespecíficos que podrían enmascarar la observación se empleó 0,25 % de suero de cabra. Se eliminó el exceso de anticuerpo primario con 3 lavados con PB y se procedió a la incubación durante una hora a 20°C en la oscuridad, de anticuerpos secundarios conjugados con Alexa dilución 1/1000. Por último se montaron sobre portaobjetos de vidrio con tampón PB/glicerol y se almacenaron a 4°C en la oscuridad. La observación y microfotografías se llevaron a cabo en el microscopio confocal.

#### **4.4 Estimación de la proliferación celular**

Existen en la actualidad diversos métodos para identificar y cuantificar proliferaciones celulares. La corta duración de la mitosis en comparación con el ciclo celular completo y la difícil visualización de la condensación de cromatina hacen de métodos basados en estos hechos, un pobre indicador de la capacidad

de proliferación. Considerando al mismo tiempo, que las células de un cultivo proliferante no son sincrónicas y que coexisten en un mismo cultivo células en todas las fases, en el presente estudio hemos llevado a cabo dos métodos diferentes para el análisis de proliferación celular inducido por subunidades  $G\alpha$ -miristoiladas.

El marcaje más comúnmente empleado es la timidina portadora del isótopo radiactivo, tritio (timidina tritiada) porque, en primer lugar, la timidina es necesaria y específica para la replicación cromosómica y, en segundo lugar, porque, al estar marcada radiactivamente, permite la cuantificación de las células en las que se ha incorporado.

El segundo método empleado en este estudio está basado en la detección inmunohistoquímica de células en fase S de la mitosis, cuyo ADN incorpora y retiene Ioduro de propidio (IP). Es una de las formas citológicas más fáciles y rutinarias actualmente empleadas que otorga una visión completa y consecuente, al permitir registrar las diferencias del número de células totales que incorporan este marcador nuclear en cultivos controles y tratados.

El IP intercalado en el ADN celular, es detectado mediante microscopía confocal (Abs/Em 530/615) y los datos así obtenidos pueden ser cuantificados mediante un programa de análisis de imagen. En nuestro caso, hemos empleado el programa de Leica Q500 M.C. Los protocolos que se han seguido en ambos casos se detallan seguidamente.

#### **4.4.1 Incorporación de timidina tritiada**

Para los ensayos de la actividad mitótica con incorporación de timidina tritiada, se utilizaron placas de 96 pocillos, en las que se sembraron inicialmente  $1,5 \times 10^4$  células por pocillo, resuspendidas en BME/F-10S. Se permitió su adhesión durante 5-6 horas y se cambiaron a medio BME/F-1S, en el que permanecieron 10-12 horas. A continuación se eliminó este medio y se cambió por las soluciones de las fracciones a ensayar preparadas con BME/F-1S como disolvente. Como controles se utilizaron pocillos con los medios mencionados.

En un primer paso se administró a los astrocitos sembrados como anteriormente hemos indicado, a distintos *tiempos* de incubación y distintas *concentraciones* (0,02, 0,2 y 2 nM) de la subunidad  $G_{\alpha_{i2}}$ -miristoilada. La estimación de la división celular promovida por la administración de estas proteínas  $G_{\alpha}$ , requirió 12 horas de incubación y fue medida mediante la incorporación de timidina tritiada (**Amersham**)

Los datos obtenidos en este experimento, nos sirvieron de base para complementar el análisis gráfico obtenido tras el examen confocal del tratamiento con los compuestos que alteran tanto la endocitosis, como el mecanismo de acción de PKA/PKC anteriormente comentados. El protocolo que se siguió es el siguiente: Los astrocitos sembrados en placas de 96 pocillos a la densidad y características indicadas en el párrafo anterior se les incubó durante 1 hora, con concentraciones decrecientes ( $10^{-8}$  a  $10^{-11}$ ) de **filipina**, **colchicina**, **nocodazol**, **monensina**, **cheleritrina**, **H7** y **H8**. Posteriormente y sin retirar los tratamientos efectuados, adicionamos  $G_{\alpha_{i2}}$ -miristoiladas (0,2 nM/pocillo) junto con un pulso de



timidina tritiada ( 0,5  $\mu$ Ci/pocillo) incubandose en estufa a 37°C y en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 12 horas.

Transcurridas 12 horas de incubación, se eliminó el medio, se lavaron los cultivos dos veces con PBS 0,1 M, y se les añadió 20  $\mu$ l SDS 0,04% junto con 200 $\mu$ l de líquido de centelleo (CYTOSCINT/ ICN **Biomedicals**). Tras 6 horas de incubación se midió su radioactividad en un contador de centelleo líquido LKB.

#### **4.4.2 Ensayos con yoduro de propidio**

Todos los tratamientos detallados en el apartado anterior, se llevaron paralelamente en astrocitos plaqueados sobre cubres de 10 mm de diámetro pretratados con poli-L-lisina, para realizar sobre estos, estudios de proliferación celular con el marcador específico yoduro de propidio (IP) (**Sigma**), marcador fluorescente que detecta ADN tanto de una como de dos cadenas. Contiene un grupo plano que le permite intercalarse entre las bases del ADN y tiene un espectro de emisión de 590 nm.

El protocolo que seguimos tras respetar los distintos periodos de incubación indicados en cada apartado fue el siguiente: como primer paso, se realizaron sucesivos lavados con PB 0,1 M para posteriormente proceder a la fijación de las células con paraformaldehído al 4 % durante aproximadamente 15 minutos. Tras efectuar otros dos lavados con PB 0,1 M y retirar así los restos posibles del aldehído, las células fijadas sobre los cubres se incubaron sobre una gota (45  $\mu$ l) del marcador específico IP (1:1000) en 0,1% de Tritón en PB 0,1 M durante 15 minutos. Posteriormente se retiró el exceso de marcador y se montaron sobre

portaobjetos de vidrio con tampón glicina-glicerol para realizar con el microscopio confocal tomas de diferentes campos correspondientes a cada tratamiento. La media del número de núcleos teñidos con el marcador específico fue analizada mediante el programa Leica Q 500 y tratada posteriormente con Excel para la obtención de los correspondientes histogramas.

### **5. Análisis estadístico**

En los experimentos de analgesia, las diferencias significativas se determinaron por análisis de varianza (Anova) seguido del test de Student-Newman-Keuls. El nivel de significación empleado fue  $p \leq 0,05$ , utilizando el programa estadístico Sigma-Stat SPSS. Inc (versión 2.0). Para cuantificar la información de las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal, se han obtenido los histogramas correspondientes a las mismas, cuya información ha sido posteriormente procesada utilizando el sistema de tratamiento de imagen IDL (versión 5.4).

La incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina en astrocitos, se ha medido con el contador de centelleo líquido LKB, determinandose las diferencias significativas al igual que en analgesia, mediante análisis de varianza (Anova), test de Student-Newman-Keuls, empleando el programa estadístico Sigma-Stat. La cuantificación de los núcleos de las células en cultivo, teñidos previamente con IP y registrados con el microscopio confocal, se llevó a cabo mediante el programa específico LEICA Q500MC Image Analysis System.







**1. Estudios estructurales**

Para descartar posibles daños tisulares como consecuencia de la administración de los tratamientos mediante inyección i.c.v. se realizó una tinción Nissl. Los niveles prioritariamente seleccionados fueron la zona periventricular adyacente al lugar de la inyección 140  $\mu\text{m}$  anterior a la bregma y la sustancia gris periacueductal, correspondiente a un corte 2.060  $\mu\text{m}$  posterior al punto bregma según el atlas de Paxinos y Franklin ya que en esta estructura se localizan la gran mayoría de los receptores opioides que median la analgesia supraespinal (Mansour 1987, 1989). En la figura 8 (superior), mostramos una sección representativa a nivel del punto bregma teñida con Nissl confirmando que la administración i.c.v. no provoca daños tisulares, manteniéndose en todo momento la integridad estructural del tejido que hace posible llevar a cabo los correspondientes estudios estructurales.

### **1.1 Detección de zonas específicas de unión IgGs anti- $G\alpha_{i2}$ /proteína $G\alpha_{i2}$ endógena**

Por estudios previos realizados en nuestro laboratorio sabemos que una única administración de IgGs purificadas frente a  $G\alpha$ , es capaz de reconocer y unirse a dicha subunidad *in vivo* (Garzón y col., 1998). Basandonos en ello, en el presente trabajo hemos realizado un estudio con el microscopio de fluorescencia AXIOVERT 35 (ZEISS) sobre cortes coronales seriados de 20  $\mu\text{m}$  de espesor de cerebros de ratones tratados con 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de IgGs anti- $G\alpha_{i2}$ -marcadas con fluorescencia, según el procedimiento detallado en el apartado 1.6 de Materiales y Métodos. En paralelo y para comprobar la especificidad del inmunomarcaje, se llevaron cortes de cerebros de animales a los que se les administró durante los 4

días previos al contacto con el anticuerpo, un ODN dirigido al ARNm que codifica dicha proteína  $G\alpha_{i2}$  impidiéndose así su síntesis (protocolo indicado en el punto 3.1.2 de Materiales y Métodos), y como controles, cortes pertenecientes a animales tratados con un oligo de secuencia aleatoria (ODN-RD) que se sabe no interfiere con la síntesis de estas proteínas (Sánchez-Blázquez y col., 1995). Tras el tratamiento, se procedió a la extracción, congelación y obtención de los cortes en criostato, los cuales se recogieron sobre portas gelatinizados y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su observación.

Los resultados obtenidos confirman que tras su administración i.c.v. las IgGs anti- $G\alpha_{i2}$  son capaces de detectar la presencia de la proteína  $G\alpha_{i2}$  en diferentes estructuras del cerebro de ratón confirmando que se produce un proceso de difusión desde la cavidad ventricular al espesor del tejido. Por otra parte, mientras que el tratamiento con el ODN-RD previo a la administración de estas IgGs, no altera el patrón inmunofluorescente correspondiente a la entrada de esta proteína, el considerable descenso en la señal fluorescente que se observa en los animales  $G\alpha_{i2}$ -deficientes tras la administración de ODNs específicos, demuestran la selectividad del inmunomarcaje, confirmando en este punto que la entrada de estas IgGs es dependiente de la presencia de su antígeno específico.

Posteriormente, y una vez comprobada la especificidad del inmunomarcaje, llevamos a cabo un minucioso análisis de todas las estructuras cerebrales comprendidas entre el nivel 1,18 mm anterior a 4,96 mm posterior al punto bregma, pudiendo identificar un claro marcate tanto en zonas de la corteza frontal, concretamente en cíngula y cuerpo calloso, como a nivel del caudado putamen.



Además se identificó una intensa señal periventricular, con evidente difusión hacia zonas más internas incluyendo a estructuras como habénula y núcleos paraventricular y periventricular. Este marcaje se mantuvo en cada corte de 20  $\mu\text{m}$  estudiado, hasta alcanzar un total de 2 mm tanto posteriores como anteriores al nivel bregma, si bien y en ambos sentidos, se redujo progresivamente la intensidad del marcaje en cuerpo calloso y especialmente, en cíngula.

A 3,88 mm posterior al punto bregma según el atlas de Paxinos y Franklin, se ha detectado una considerable señal a nivel de la amígdala y núcleo del rafe, si bien el máximo nivel de detección se localizó a la altura del acueducto, más concretamente en la sustancia gris periacueductal, por lo que nos centramos en esta estructura de forma sistemática para nuestro estudio comparativo de microscopía confocal, ya que, como anteriormente indicamos, en ella se localizan la gran mayoría de los receptores opioides que median la analgesia supraespinal. En la tabla 3 hemos recogido los resultados de este estudio, representando con cruces la mayor o menor señal fluorescente observada y sirviendonos de base para un posterior examen con el microscopio confocal de las estructuras de mayor interés para nuestro estudio.

### **1.2 Resultados de la administración in vivo de proteínas recombinantes $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas**

En paralelo al estudio anterior, llevamos a cabo la observación con el microscopio de fluorescencia de cortes coronales seriados de 20  $\mu\text{m}$  de espesor de cerebros de ratones inyectados con la proteína recombinante  $G\alpha_{i2}$ -miristoilada

marcada con una sonda fluorescente. Este examen hizo posible comprobar la internalización de esta proteína administrada *in vivo* y de caracterizar su localización. Los animales recibieron mediante microinyección en el ventrículo lateral derecho, una única dosis de 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de  $\text{G}\alpha_{i2}$ -miristoiladas-Fluos. Posteriormente se procedió como en el caso anterior, al sacrificio, extracción e inmediata congelación de los cerebros. Tras su inclusión en Tissue-tek, se obtuvieron los cortes seriados de 20  $\mu\text{m}$  de espesor en el criostato que se recogieron sobre portas gelatinizados y se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su observación en el microscopio de fluorescencia.

De la misma forma que se hizo para la detección de las zonas de unión del anticuerpo con la proteína endógena, se analizaron todas las estructuras cerebrales comprendidas entre los niveles 1,18 mm anterior a 4,96 mm posterior al punto bregma sobre los cortes coronales de los cerebros tratados con la proteína recombinante  $\text{G}\alpha_{i2}$ -miristoiladas-Fluos, observando su ubicación principalmente en zonas comprendidas entre los niveles 1,20 mm anterior a 3,50 mm posterior a la bregma.

**Tabla 3: Estudio comparativo de las zonas de entrada y localización del anticuerpo anti- $\text{G}\alpha_{i2}$ -fluos y la proteína recombinante  $\text{G}\alpha_{i2}$ -miristoilada-fluos**

	<b><math>\text{G}\alpha_{i2}</math>-miristoilada</b>	<b>IgGs anti-<math>\text{G}\alpha_{i2}</math></b>

<b><u>Telencéfalo</u></b>		
n. accumbens	-	-
cíngula	-	++
cuerpo calloso	-	++
hipocampo	-	-
nucleo acumbens	-	+
caudado putamen	+	+++
<b><u>Diencefalo</u></b>		
n. supraóptico	+	++
n. paraventricular	++	+++
n. arcuado	-	+
n. periventricular	++	++++
n. centromedial	-	-
habénula	+	+++
<b><u>Mesencéfalo</u></b>		
SGPA	+++	++++
amígdala	+	++
n. dorsal del rafe	++	+++

En esta tabla hemos representado con cruces la mayor o menor intensidad de señal fluorescente observada en distintas estructuras de cerebro de ratón tras la administración i.c.v de 4µl de proteínas recombinante G $\alpha_{i2}$ -miristoiladas-luos(0,1µg/µl) o de IgGs anti-G $\alpha_{i2}$  (0,25µg/µl).

En los niveles anteriores, la señal se localizó alrededor de los ventrículos, débilmente en estriado, llegando a ser inapreciable a nivel de corteza, cuerpo calloso y cíngula. En niveles más posteriores, el marcaje fluorescente se localizó únicamente en la sustancia gris periacueductal, siendo apenas inapreciable la señal en estructuras como amígdala y rafe. (Tabla 3).

### 1.2.1 Cambios en el patrón de la internalización de IgGs anti- $G\alpha_{i2}$ , inducidos por el tratamiento con agonistas o PTX.

Hasta este punto, hemos confirmado como la administración de ODNs frente a secuencias específicas de la proteína  $G\alpha_{i2}$ , provoca un descenso considerable en la entrada de anticuerpos anti- $G\alpha_{i2}$  y hemos establecido tanto las zonas de unión de la IgGs anti- $G\alpha_{i2}$  con la subunidad  $G\alpha_{i2}$ -endógena como la localización de la proteína recombinante  $G\alpha_{i2}$  al ser administrada vía i.c.v.

Seguidamente analizamos en ratones tratados con IgGs anti- $G\alpha_{i2}$  (0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) o con subunidades  $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas (0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), las posibles diferencias en la entrada y localización que podrían promover los tratamientos con PTX, toxina que impide el acoplamiento funcional de las subunidades  $G\alpha_{i2}$ -endógenas y el efecto de la administración de un agonista opioide como morfina, a dosis capaces de producir un efecto analgésico en animales controles de 80% MEP (10 nmoles/ratón). Las pautas de administración se muestran en el siguiente esquema:

<b>0,25 <math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math> IgGs anti-<math>G\alpha_{i2}</math></b>	<b>0,1 <math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math> <math>G\alpha_{i2}</math>-miristoilada</b>
<b>control</b>	
<b>morfina</b> 10nmoles/ratón (DE80 )/30 min antes	10 nmoles/ratón(DE80 )
<b>PTX</b> 0,5 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ (previamente)	0,5 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ (previamente)
<b>PTX-morfina</b> 0,5 $\mu\text{g}$ PTX+Morfina (DE80 )	0,5 $\mu\text{g}$ PTX+Morfina (DE80 )

Trabajamos con cuatro grupos de animales diferentes para el estudio con IgGs y otros cuatro grupos paralelos para las administraciones de subunidades  $G\alpha_{i2}$ . Los controles recibieron mediante microinyección en el ventrículo lateral derecho, 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  IgGs anti- $G\alpha_{i2}$  o 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de proteína recombinante  $G\alpha_{i2}$ -miristoilada mientras que a otros animales se les administró 30 minutos antes del anticuerpo o de la proteína marcada, una dosis aguda de morfina (DE80). Otro grupo fueron tratados con la toxina pertúsica (0,5  $\mu\text{g}/\text{ratón i.c.v.}$ ), 5 días previos a la administración de las IgGs o de las proteínas y el último grupo recibió además una dosis aguda de morfina (DE80).

Los resultados obtenidos fueron analizados con el microscopio de fluorescencia, observandose una intensa señal fluorescente tanto a nivel periventricular como en la sustancia gris periacueductal, en los cortes correspondientes a cerebros de animales que habían recibido morfina 30 minutos antes de la administración de las IgGs. El pretratamiento con PTX, provocó un descenso de esta señal fluorescente en SGPA y a nivel periventricular, llegando a ser nula en estructuras como cíngula, cuerpo caloso y estriado. Por el contrario, ni el agonista opioide, ni el pretratamiento con la toxina indujeron cambios en el patrón de entrada de la subunidad  $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas-Fluos administrada i.c.v.

Hay que mencionar que en ninguno de los casos, se detectaron otras zonas de internalización diferentes a las anteriormente descritas. El análisis detallado de los resultados observados a nivel del SGPA tras la administración de anticuerpos anti- $G\alpha_{i2}$  o de la proteína recombinante, se muestran en el siguiente apartado.

## **2. Microscopía confocal**

Una vez identificadas las estructuras que presentan una mayor entrada y localización de la IgGs anti-G $\alpha_{i2}$  como de la proteína exógena al ser administradas in vivo, hemos procedido a registrar los niveles más relevantes ( $\approx 3,88$  mm posterior al punto bregma) de los tratamientos anteriormente mencionados, realizando esta vez una detección y posterior análisis de las imágenes captadas mediante microscopía confocal para hacer posible la cuantificación de las mismas.

El estudio de microscopía confocal se llevó a cabo sobre los cortes coronales recogidos en portas gelatinizados y conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , pertenecientes a ratones que recibieron el mismo tratamiento que los analizados en el microscopía de fluorescencia. En todas las tomas se utilizó un objetivo de 16, excepto en algunas ocasiones en las que se requirió una observación más minuciosa, empleándose entonces objetivos de 40, 63 ó 100, manteniendose los parámetros seleccionados en virtud de una buena visualización de los controles, para el resto de los tratamientos y que corresponden a las siguientes medidas: Pinhole **90**; Voltaje **589** y Fondo **0**.

Para valorar la información de las imágenes, se han obtenido los **histogramas** correspondientes a las mismas. Cada histograma es una medida de la distribución relativa de los niveles de intensidad de una imagen, indicando el número de pixels que corresponde a cada nivel de intensidad. La representación gráfica del histograma tiene como abscisa el nivel de intensidad en el rango dinámico entre 0 y

250, mientras que en eje de ordenadas se indica el número de pixels para cada nivel de intensidad en la imagen, expresado en escala logarítmica.

Los histogramas muestran un máximo, correspondiente al nivel de fondo de imagen, con una distribución de niveles de intensidad de 0 a 40. Por otro lado, a partir de niveles de intensidad 150 se obtiene una distribución irregular correspondiente a un número muy bajo de pixels que podemos considerar irrelevante. Por tanto, la distribución del histograma en el rango 40 a 150 es la que proporciona una medida del contenido de información, que se corresponde directamente con el marcaje detectado en la imagen confocal.

Posteriormente se ha procedido a cuantificar de forma objetiva este nivel de información para cada imagen analizando los histogramas, como mostramos en el punto 2.3 de este mismo apartado.

El análisis conjunto de los histogramas obtenidos, es al mismo tiempo, una herramienta fundamental para control de calidad del experimento. Se observa que las imágenes han sido tomadas en las mismas condiciones, ya que las distribuciones de los histogramas en torno al valor máximo, correspondiente al nivel de fondo imagen, son similares. Por otra parte, no se observa saturación apreciable en ninguna de las imágenes (nivel 255). Podemos concluir, por tanto, que las imágenes experimentales son comparables.

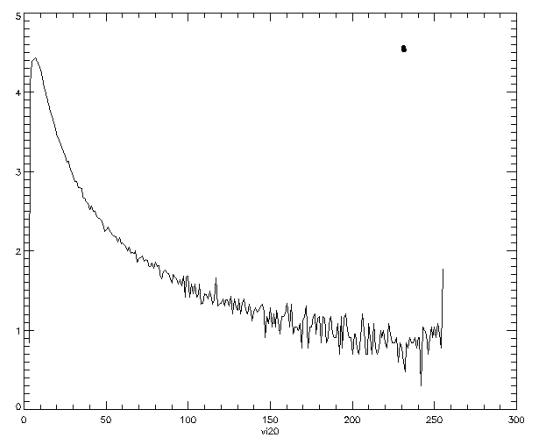
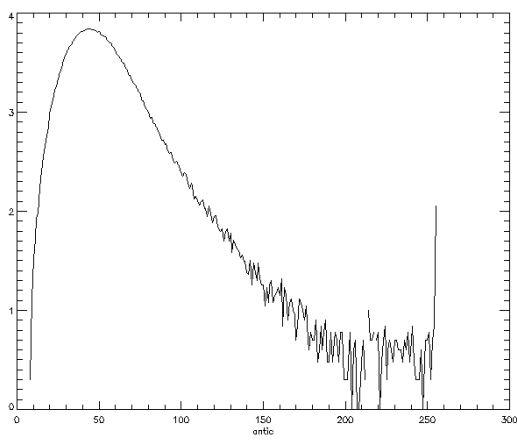
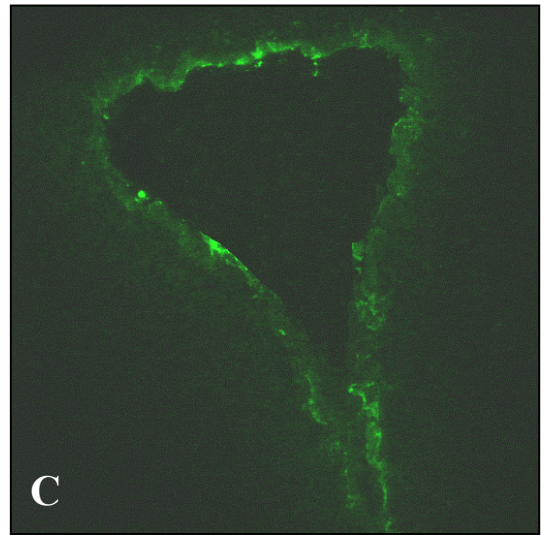
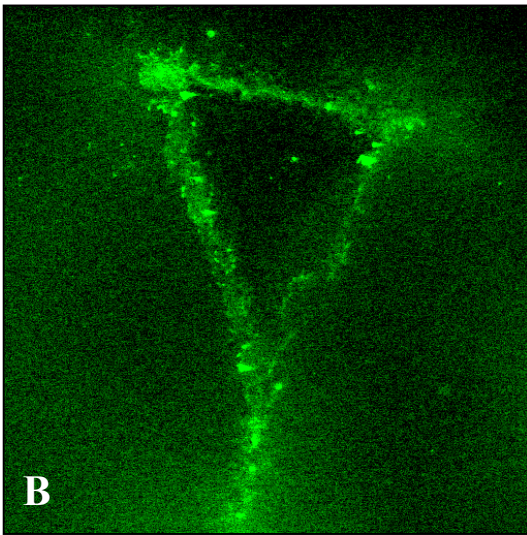
Estos datos han sido procesados utilizando un sistema de software ampliamente utilizado en el campo experimental para análisis interactivo y

visualización de datos científicos denominado **IDL** (Interactive Data Language), versión 5.4.

**Figura 8: Sección representativa de los ventrículos laterales a nivel del punto bregma teñida con Nissl (A). En la parte media se muestran las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal con objetivo 16-1,60 zoom (B y C), procedentes de cortes coronales a este mismo nivel correspondientes a cerebros de ratones a los que se les administró 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  IgGs anti- $\text{G}\alpha_{i2}$  (B), ó 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de proteína recombinante  $\text{G}\alpha_{i2}$ -miristoilada (C) marcadas con fluoresceína.**

La información aportada por estas imágenes fue analizada en sus correspondientes histogramas (inferior), cuya interpretación determina la gran diferencia en la distribución del valor máximo entre ambas imágenes. El marcaje del anticuerpo a nivel ventricular muestra una distribución de los niveles de intensidad máxima entre 0 a 40, mientras que para  $\text{G}\alpha_{i2}$ -exógenas estos valores están comprendidos entre 0 a 20. Estas diferencias dificultan el estudio cuantitativo, eligiéndose para llevar a cabo este estudio, otras estructuras en las que tanto el nivel de fondo como los niveles máximos presentan una distribución semejante.





**1 Resultados de la administración de IgGs anti- $G\alpha_{i2}$  analizados mediante microscopía confocal.**

Mediante microscopía confocal hemos sido capaces de detectar en los distintos niveles la señal correspondiente a la entrada de estas IgGs marcadas con fluorescencia administradas in vivo. Para profundizar en el estudio, hemos elegido la SGPA, por ser la estructura que más información nos ofrecía tanto por el

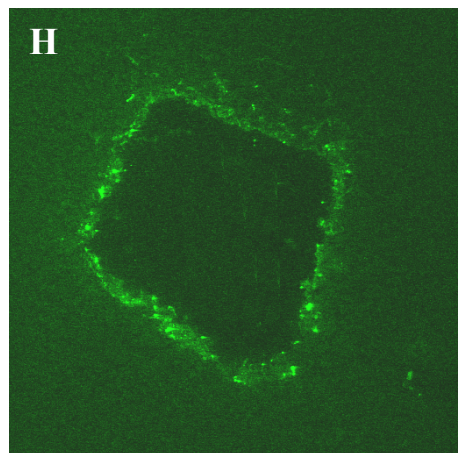
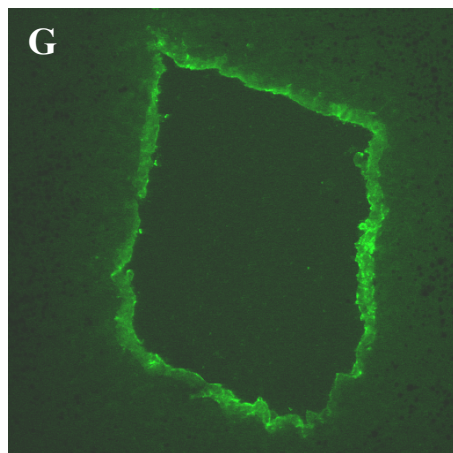
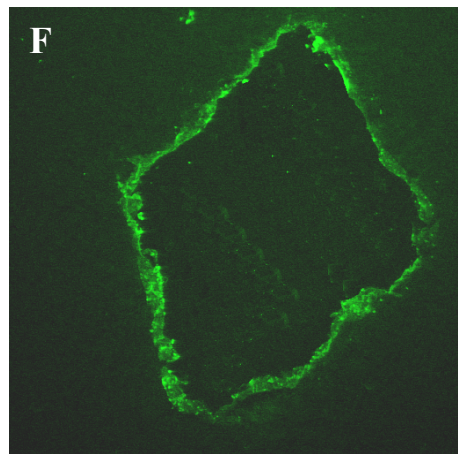
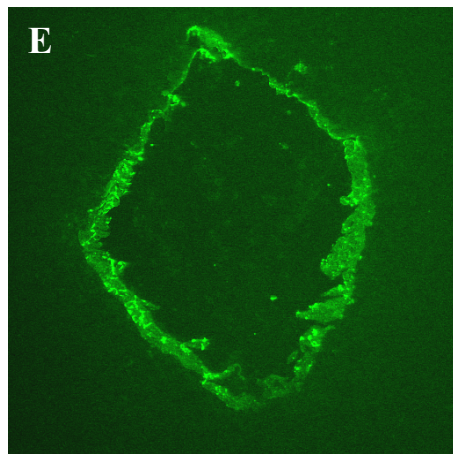
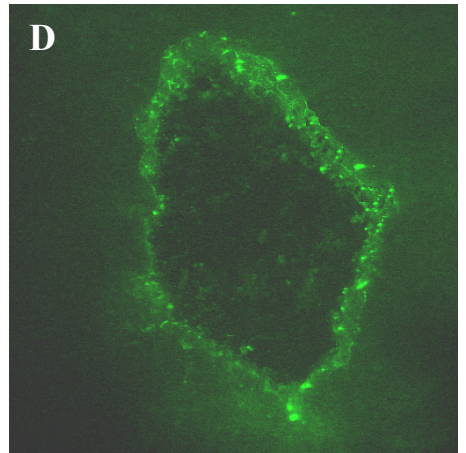
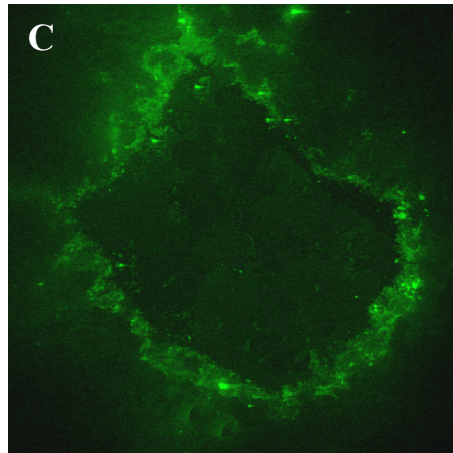
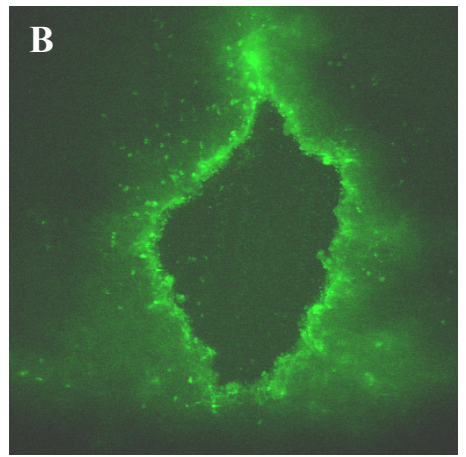
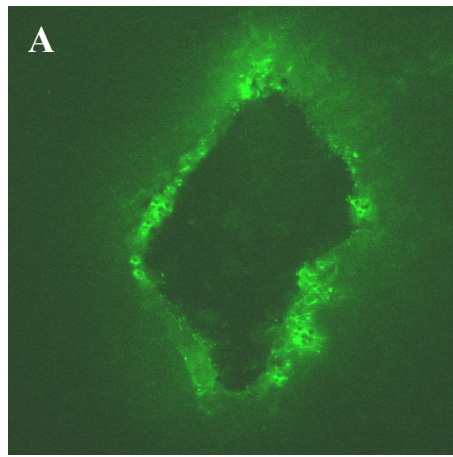
incremento en la inmunoseñal fluorescente observada a este nivel, así como por localizarse en ella la gran mayoría de los receptores opioides que median la analgesia supraespinal. Los resultados obtenidos, corresponden a cuatro grupos de animales sobre los que realizamos los siguientes tratamientos. El grupo control (Fig 9A) recibió 4  $\mu$ l de IgGs anti-G $\alpha_{i2}$  purificadas marcadas con fluoresceína (0,25 $\mu$ g/ $\mu$ l), según el procedimiento detallado en la sección 1.6 de Materiales y Métodos. Otro de los grupos recibió una dosis aguda (10 nmoles/ratón) del agonista opioide morfina, 30 minutos previos a la administración de la IgGs anti-G $\alpha_{i2}$ -Fluos (Fig 9B). Los otros dos grupos, fueron tratados con la toxina pertúsica (0,5  $\mu$ g/ratón i.c.v.) 5 días previos a la administración de IgGs anti-G $\alpha_{i2}$ -Fluos (Fig 9C), y uno de los dos recibió además morfina, 30 minutos antes de la administración del anticuerpo (Fig 9D).

Transcurridos 10 minutos de la administración de las IgGs-FLUOS, se sacrificaron los animales para la inmediata obtención y congelación de los cerebros, los cuales, incluídos en Tissue-tek se cortaron en secciones coronales de 20  $\mu$ m de grosor en el criostato, se recogieron sobre portas gelatinizados.

Las preparaciones se montaron posteriormente en PB/glicerol para facilitar su observación confocal.

**Figura 9: Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal (objetivo 16) correspondientes a cortes coronales de 20  $\mu$ m de grosor de cerebro de ratón a nivel del SGPA. En este estudio se han procesado distintos grupos siguiendo los protocolos indicados en el apartado 3.1 de Materiales y Métodos, en donde los**

controles recibieron 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de IgGs anti- $\text{G}\alpha_{i2}$  (A), ó 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de la proteína recombinante  $\text{G}\alpha_{i2}$  (E) unidos a una sonda fluorescente; la administración se realizó vía i.c.v. en el ventrículo lateral derecho a ratones ligeramente anestesiados con éter en un volumen final de 4  $\mu\text{l}$ . Otro de los grupos de animales recibieron 30 minutos antes del anticuerpo (B) o de la proteína recombinante marcada (F), una dosis aguda del agonista opioide morfina (DE80). El resto de las imágenes mostradas en esta figura, corresponden a pretratamientos con 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de PTX, toxina que altera la transducción mediada por proteínas  $\text{G}_i/o$ , 5 días antes de la administración del anticuerpo anti- $\text{G}\alpha_{i2}$  (C) o de la subunidad  $\text{G}\alpha_{i2}$ -miristoilada (G). Algunos animales de estos grupos, recibieron además una dosis aguda de morfina, 30 minutos antes de la administración de la IgGs (D) o de  $\text{G}\alpha_{i2}$  (H), marcadas en todos los casos con FLUOS. La bajada de señal observada tras el tratamiento con PTX (C), así como el aumento de marcaje fluorescente tras la administración de morfina (B) indica que la internalización de IgGs anti- $\text{G}\alpha_{i2}$  es dependiente de la presencia de su antígeno correspondiente. Al mismo tiempo el análisis de estas imágenes muestra como la entrada de subunidades  $\text{G}\alpha_{i2}$  administradas *in vivo* no se ve afectada por PTX(G) ni por la administración del agonista morfina (F) ya que en ambos casos la señal recogida es semejante a la de los controles (E) .



Las imágenes más representativas se muestran en la figura 9; todas ellas están comprendidas entre zonas 3,02 mm a 4,5 mm posterior al punto bregma y centradas en la observación del SGPA por ser, como hemos dicho anteriormente, la estructura que aportó mayor información para nuestro estudio. Cada imagen corresponde a uno de los tratamientos anteriormente indicados, pudiendo establecer que las IgGs anti- $G\alpha_{i2}$  detectan la presencia de la proteína  $G\alpha_{i2}$  endógena en esta estructura. Para aportar más información a este estudio, en la parte superior de la figura 10, mostramos una magnificación obtenida mediante microscopía confocal de este mismo nivel donde podemos observar como las IgGs-FLUOS difunden hacia el espesor del tejido.

La cuantificación de la información de las imágenes (figura 9 A,B,C y D) obtenidas en el microscopio confocal está representada en los histogramas de la figura 11. Se establece que el nivel de fondo y el rango de saturación son iguales en todas las imágenes, lo que confirma que todas ellas han sido tomadas en las mismas condiciones experimentales, haciéndolas por tanto, comparables entre sí. El histograma correspondiente al grupo control, del tratamiento con IgGs anti- $G\alpha_{i2}$ , decae de forma continua desde el nivel 40 a 150.

Comparando los histogramas, observamos que existe un nivel mayor de señal en las tomas correspondientes a los animales que han recibido el agonista morfina respecto a los controles y para los tratados con PTX, en niveles bajos de intensidad, se detecta menor señal que en los controles. Esta disminución, debida al tratamiento con PTX, se recupera sutilmente con la administración de morfina, observándose solo niveles superiores de intensidad de señal en rango entre 60 y 150 y llegando a igualarse con los controles en niveles entre 80 a 150.

## ***2.2 Análisis confocal de la internalización e incorporación a la cascada de señales de proteínas $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas-exógenas***

La observación confocal de la internalización de esta proteína se realizó sobre cortes coronales seriados de 20  $\mu\text{m}$  de espesor de cerebros de cuatro grupos de ratones. El grupo control recibió una única dosis de 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de proteínas recombinantes  $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas, marcadas con una sonda fluorescente. Otro de

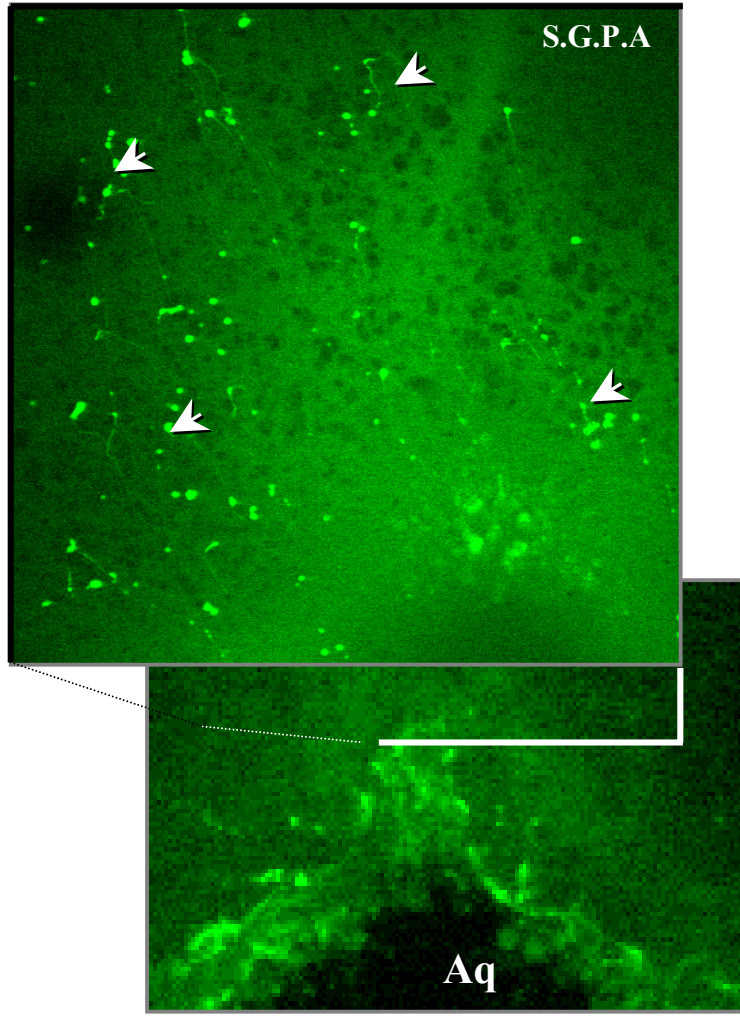


los grupos recibió una dosis aguda del agonista opioide morfina, 30 minutos previos a la administración de la subunidad  $G\alpha_{i2}$ -Fluos. Los otros dos grupos, fueron tratados con una dosis única de toxina pertúsica ( $0,25\mu\text{g}/\text{ratón i.c.v.}$ ), 5 días previos a la administración de la proteína recombinante  $G\alpha_{i2}$ -miristoilada Fluos, y uno de los dos recibió además morfina, 30 minutos antes de la administración del anticuerpo. La extracción, congelación, obtención de cortes y procesamiento de las muestras para la observación posterior en el microscopio confocal, se realizó siguiendo el mismo protocolo empleado en la administración de los anticuerpos.

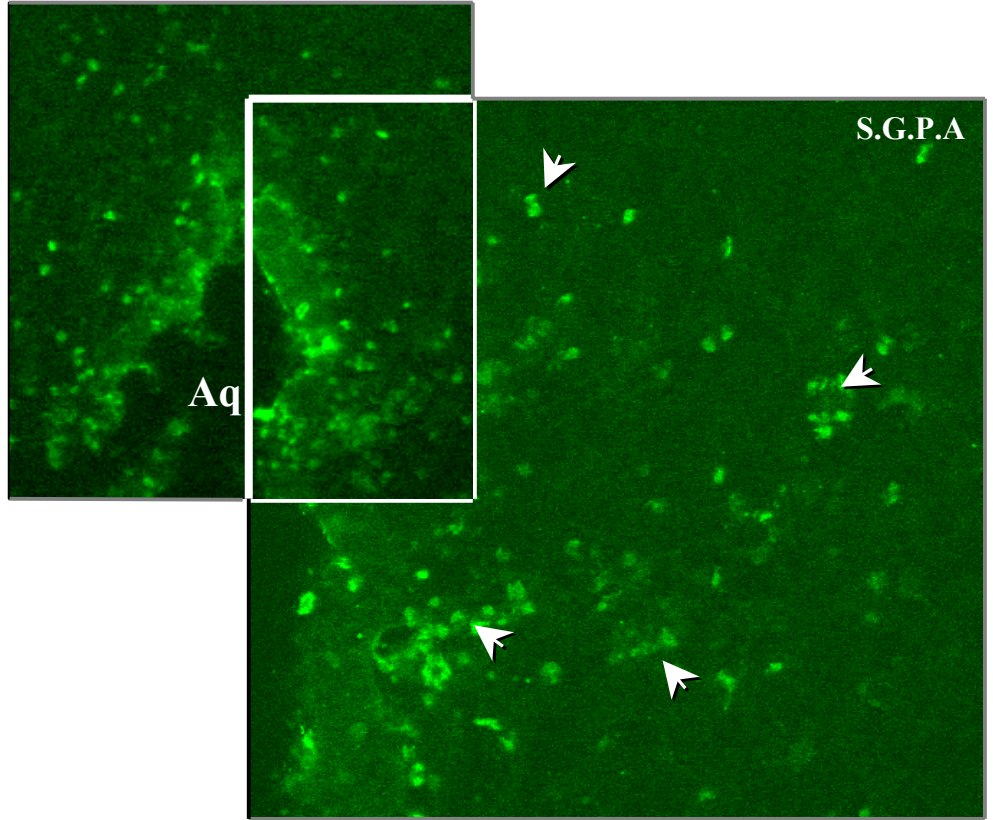
**Figura 10. Magnificaciones obtenidas mediante microscopía confocal (objetivo de 63) del SGPA de ratones que recibieron  $4\mu\text{l}$  de IgGs anti- $G\alpha_{i2}$  ( $0,25\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) o de la proteína recombinante  $G\alpha_{i2}$  ( $0,1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Como podemos apreciar, las IgGs marcadas con fluoresceína penetran en el espesor del tejido, mientras que la subunidad  $G\alpha_{i2}$ -FLUOS marca prioritaria e intensamente cuerpos celulares.(indicado mediante flechas en la figura)**



**IgGs anti-G $\alpha_{i2}$ -FLUOS**



**G $\alpha_{i2}$ -miristoilada-FLUOS**



El análisis confocal (figura 9 E, F, G y H) confirma la internalización de esta proteína administrada mediante microinyección en el ventrículo lateral derecho, al identificar un intenso y puntual marcaje en niveles 3,20 mm a 4,02 mm posterior al punto bregma según el atlas de Paxinos y Franklin, localizándose fundamentalmente en estructuras como SGPA y de menor manera en el núcleo del rafe.

En niveles anteriores al punto bregma, solo se identificó señal fluorescente en zonas periventriculares, siendo el marcaje a este nivel menor que el observado en SGPA. Al mismo tiempo es importante destacar, que tanto el tratamiento agudo con el agonista opioide morfina (DE80), 30 minutos antes de la administración de  $G\alpha_{i2}$ -miristoilada-FLUOS, como el pretratamiento con PTX 5 días antes de recibir dicha proteína exógena marcada, no provoca ningún cambio significativo de intensidad de señal, ni afecta en la entrada de esta proteína a los niveles

analizados.

La cuantificación de la información de las imágenes obtenidas en el microscopio confocal está representada en los histogramas de la figura 12. El histograma correspondiente al tratamiento con la proteína  $G\alpha_{i2}$ -miristoilada, muestra una zona característica de mayor intensidad en niveles de pixel comprendidos entre 40 y 60 unidades, que no se observa en las mismas condiciones bajo el tratamiento con IgGs.

El análisis cuantitativo correspondiente a las imágenes de los animales tratados con morfina, 30 minutos antes de recibir la subunidad  $G\alpha_{i2}$ -miristoilada exógena, no muestra niveles de intensidad superior a la de los controles, pudiéndose observar que incluso se atenúa la discontinuidad característica obtenida en los mismos entre los niveles 40 a 60.

Esta misma apreciación la podemos observar en la representación correspondiente a los tratamientos con PTX al mismo tiempo que registramos una sutil disminución de la intensidad de la señal respecto a los anteriores, concluyendo por tanto, que ninguno de estos tratamientos influyeron aparentemente en la entrada de esta proteína administrada directamente en cerebro de ratón.

El análisis del histograma correspondiente a animales que tras el tratamiento con PTX recibieron morfina 30 minutos antes de la proteína recombinante, muestra una pequeña recuperación de esta zona de mayor intensidad característica del tratamiento con subunidades  $G\alpha_{i2}$ -exógenas, si bien no se aprecian diferencias

significativas respecto a los controles. Si bien y como ya hemos indicado, nos hemos centrado en la caracterización de los efectos observados a nivel de SGPA por ser la estructura que aporta mayor información a este estudio, en este punto mostramos el análisis de los histogramas correspondientes al núcleo del rafe (imagen confocal no mostrada), en donde pudo detectarse marcaje fluorescente entre los niveles 4,48 a 5,20 mm posterior al punto bregma. Este estudio se ha llevado en paralelo y sobre los mismos cortes correspondientes a los animales a los que se les administró bien IgGs anti- $G\alpha_{i2}$  o las subunidades  $G\alpha_{i2}$ -exógenas (controles), siguiendo el protocolo detallado en este mismo apartado (Figura 13).

El análisis de esta información, no aporta mas datos que los recogidos anteriormente, ya que la inmunoseñal a este nivel es más débil, si bien confirmamos que los valores correspondientes a la administración de la proteína recombinante es inferior a la señal recogida por las IgGs, y que presenta el nivel discontinuo de intensidad entre 40 a 60 pixels característica de esta proteína.

### **2.3 Análisis cuantitativo de los histogramas**

Como indicamos en el punto 2 de este mismo apartado de resultados, se ha calculado para cada imagen de la figura 9, la suma ponderada del logaritmo natural de distribución del histograma, que proporciona una estimación de la cantidad de información en el rango dinámico considerado como relevante en nuestros experimentos (40-150), según indicamos seguidamente, donde  $I$  es nuestra estimación de la cantidad de información y  $H_{(ni)}$  es el valor del histograma para el nivel “ni” de la imagen.

$$I = \sum_{i=1}^L n_i \log H_{(n_i)}$$

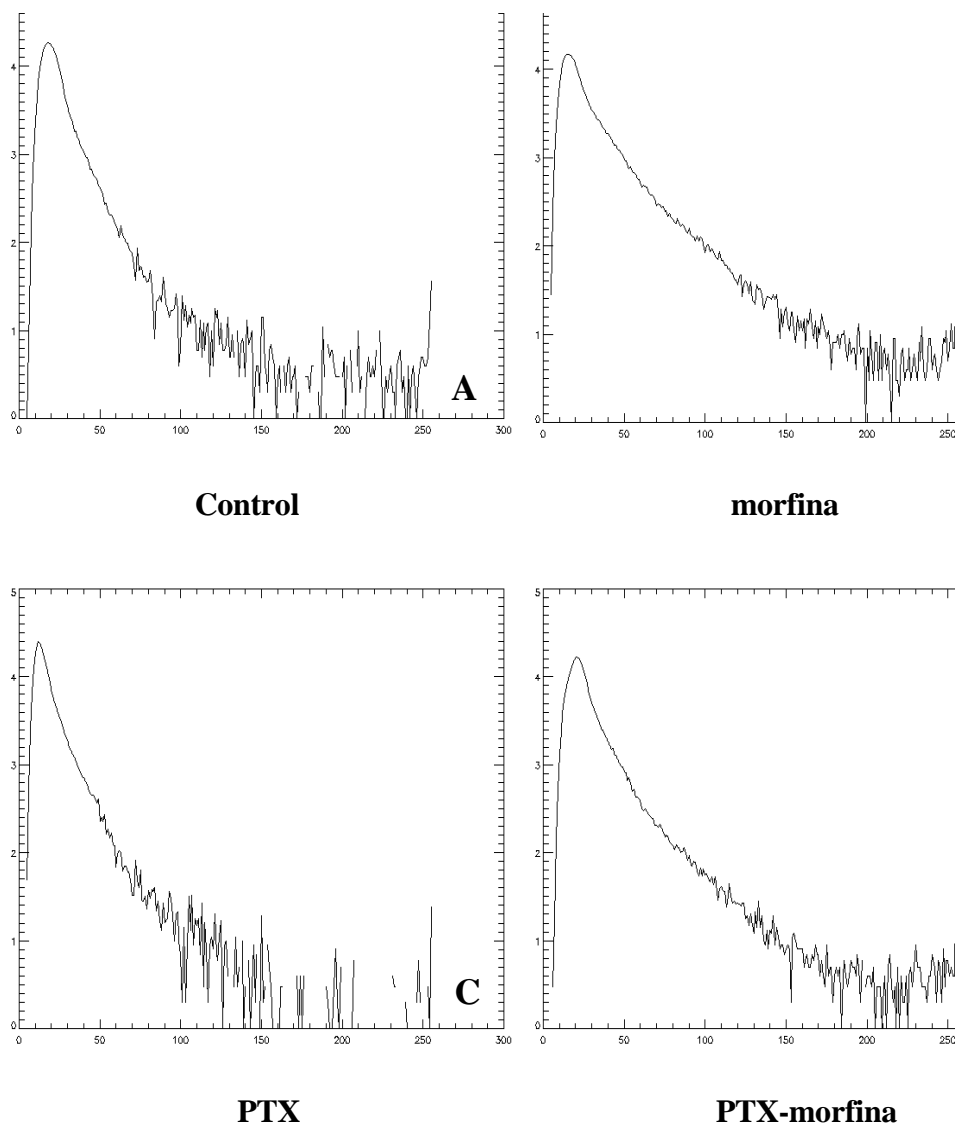
$$L=40$$

[Eq. 1]

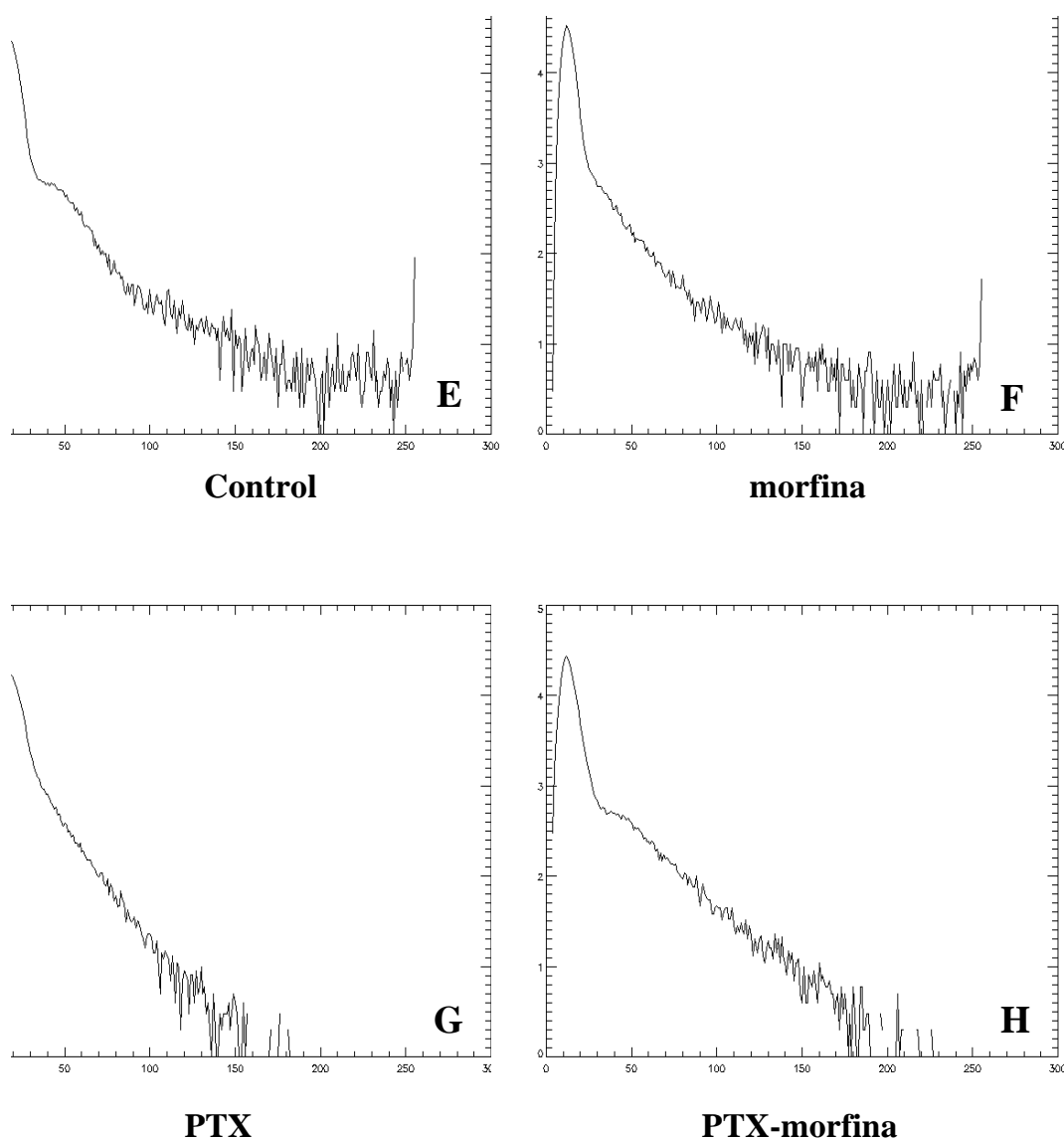
I = cantidad de información

H<sub>(ni)</sub> = valor del histograma para el nivel "ni" de la imagen

Los resultados aparecen resumidos en la tabla 4, donde se indica el valor I calculado para cada una de las imágenes anteriormente mencionadas. Como podemos comprobar, la administración de morfina induce un aumento significativo de la inmunoseñal correspondiente a la unión de IgGs marcadas, con G $\alpha_{i2}$ -miristoiladas.



**Figura 11. Histogramas correspondientes a las imágenes representadas en la figura 9 (A, B, C y D). Cada histograma indica la distribución relativa de los niveles de intensidad de una imagen indicando el número de pixels para cada nivel de intensidad. En abscisas se indica el nivel de intensidad en el rango de cuantificación entre 40 a 150, mientras que el eje de ordenadas muestra, para cada nivel de intensidad, el número de pixels en la imagen, expresado en escala logarítmica.**



**Figura 12.** Histogramas correspondientes a las imágenes representadas en la figura 9 (E, F, G y H). Cada histograma indica la distribución relativa de los niveles de intensidad de una imagen indicando el número de pixels para cada nivel de intensidad. En abscisas se indica el nivel de intensidad en el rango de cuantificación entre 30 a 150, mientras que el eje de ordenadas muestra, para cada nivel de intensidad, el número de pixels en la imagen, expresado en escala logarítmica.

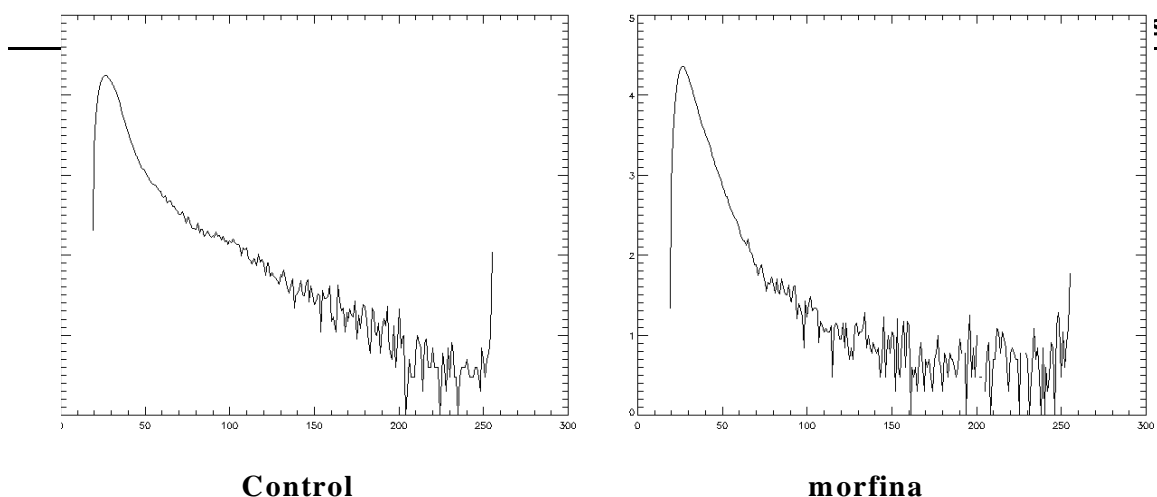
endógenas activadas por el agonista, mientras que el tratamiento con PTX provoca una disminución de la señal respecto a los controles, lo que indica que la entrada de estas IgGs está condicionada por la presencia del antígeno. Al mismo tiempo los datos recogidos indican que la internalización de  $G\alpha_{i2}$ -miristoilada no se ve alterada por toxinas que afectan directamente la funcionalidad de estas proteínas, ni por la administración de agonistas frente receptores G como morfina, cuya acción depende de la integridad de esta proteína endógena, mientras que este mismo agonista, si bien promueve un gran aumento de la inmunoseñal en el nivel seleccionado (SGPA), no es capaz de alcanzar los valores controles tras la pérdida funcional de la transducción promovida por PTX.

**Tabla 4: Análisis cuantitativo de los histogramas (figuras 11 y 12) de imágenes obtenidas mediante microscopia confocal, (figura 9) correspondientes a cerebros de ratones tratados con IgGs anti- $G\alpha_{i2}$  o con la proteína. \*Indica diferencias significativas respecto al grupo control. El nivel de significación empleado fue  $p < 0,05$**

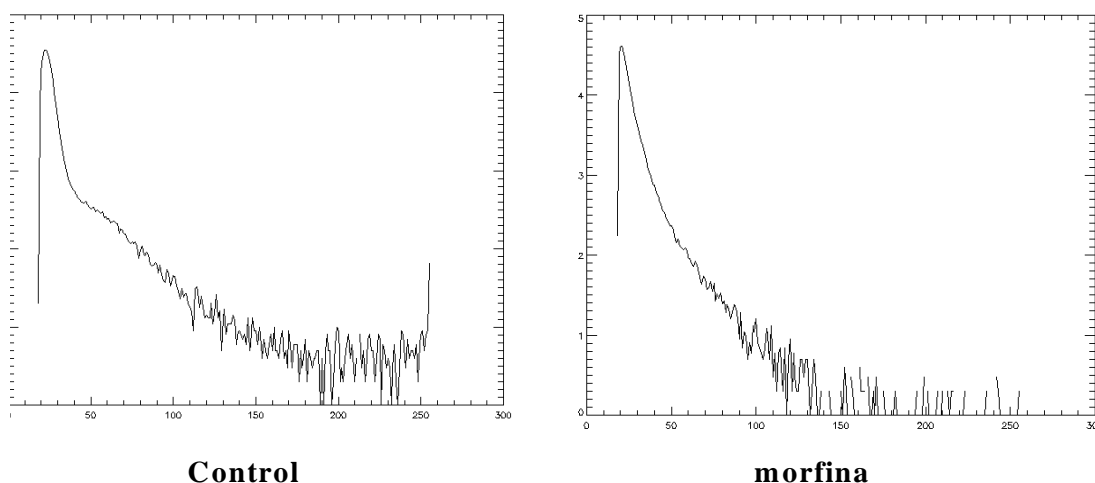
Tratamiento	IgGs anti $G\alpha_{i2}$	$G\alpha_{i2}$ -miristoilada
control	12926 $\pm$ 1105	11148 $\pm$ 1074
morfina	20222* $\pm$ 1297	13685 $\pm$ 1126
PTX	9110 $\pm$ 855	10617 $\pm$ 973
PTX-morfina	12824 $\pm$ 1135	10924 $\pm$ 1001



**IgGs anti- $G\alpha_{i2}$ -fluos**



**Proteína recombinante  $G\alpha_{i2}$ -mir-fluos**



**Figura 13: Histogramas correspondientes a las imágenes obtenidas a nivel del núcleo del rafe de animales controles a los que se les administró 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de IgGs anti- $G\alpha_{i2}$  o 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de la proteína  $G\alpha_{i2}$ -miristoilada (imágenes confocales no mostradas) o que recibieron morfina 30 minutos antes de estas proteínas. Al igual que observamos a nivel del SGPA, en el núcleo del rafe el histograma correspondiente al tratamiento con  $G\alpha_{i2}$ -miristoilada presenta una discontinuidad en niveles de pixels comprendidos entre 40 a 60, y una menor intensidad de marcaje respecto a las IgGs.**

### **3.-Estudios ultraestructurales: Microscopía electrónica**

#### **3.1. Entrada y localización de la proteína $G\alpha_{i2}$ -miristoilada**

Para caracterizar la localización a nivel subcelular de las subunidades  $G\alpha_{i2}$ -miristoilada tras su internalización, se prepararon conjugados de esta proteína con oro coloidal de diferentes tamaños de partícula (6 nm y 15 nm), siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 1.7.2 de Materiales y Métodos, administrándose a grupos de ratones previamente anestesiados, en un volumen final de 3  $\mu$ l y 7  $\mu$ l mediante microinyección en el ventrículo lateral derecho.

De forma similar a los experimentos realizados con la sonda fluorescente se procesaron varios grupos de ratones; uno de ellos recibió una proteína patrón, BSA conjugada igualmente a oro coloidal de los diferentes tamaños anteriormente indicados, y el otro grupo control un concentrado de partículas de oro suspendidas en el mismo volumen que en casos anteriores. Se designaron 2 intervalos distintos de tiempo tras la administración de la proteína recombinante  $G\alpha_{i2}$ -miristoilada marcada con oro coloidal, 15 minutos y 2 horas, transcurridos los cuales, se procedió a la fijación de los cerebros mediante perfusión vascular con una solución fijadora de 1 % paraformaldehído, 1 % glutaraldehído en solución tampón fosfato salino 0,1 M. Tras la perfusión, los cerebros se post-fijaron en el mismo líquido fijador durante toda la noche y se cortaron mediante vibrátomo en secciones de 100  $\mu$ m.

Las muestras tratadas posteriormente con 1% de tetróxido de osmio en solución tampón salina 0,1 M, se deshidrataron con alcoholes de concentración creciente para la inclusión en la resina araldita facilitandose así, la obtención de los cortes semifinos de 2  $\mu\text{m}$  en el ultramicrotomo Reihert-Jung ULTRACUTE. Estos cortes semifinos, se tiñeron con 1 % de azul de toluidina-borax para seleccionar en el microscopio óptico las zonas de interés y obtener con el ultramicrotomo, los cortes ultrafinos de 70 nm sobre los que realizamos nuestro estudio en el microscopio electrónico JEOL-1200EX. En estructuras de alto contraste (teñidas con plomo), el pequeño tamaño de las partículas de oro y el bajo número de las mismas esperado en las secciones ultrafinas del neuropilo, complica su detección entre las estructuras celulares. Para evitar este problema, se utilizaron en este estudio también, cortes ultrafinos no teñidos.

Pudimos comprobar que tanto a nivel del SGPA como a nivel ventricular, en las preparaciones correspondientes bien a animales que habían recibido la proteína recombinante  $G\alpha_{i2}$ -miristoilada conjugadas a oro 15 nm, existían grandes acúmulos de estas partículas en el exterior del tejido, si bien ninguna era capaz de penetrar al interior de las estructuras. Estos resultados fueron independientes de las distintas concentraciones (3 y 7  $\mu\text{l}$ ) y de los distintos intervalos de tiempo de corte transcurrido tras la administración de proteína marcada con oro (15 minutos y 2 horas), por lo que al no observar entrada en ninguno de los casos, manejamos la

posibilidad de que el tamaño de partícula fuera excesivamente grande, empleando para nuestras siguientes observaciones las preparaciones en las que habíamos realizado los tratamientos con los conjugados de oro con tamaño de partícula de 6 nm. De la misma forma, se descarta la penetración de oro concentrado e incluso de BSA en tiempos de incubación de 15 minutos. Así mismo a las 2 horas, en las muestras controles correspondientes a los animales tratados con oro concentrado, no pudimos observar partículas electrodensas en el interior celular que indicasen en mayor o menor grado, el paso del oro por sí mismo (imágenes no mostradas), se observan pocas partículas rodeando el acueducto, escasas a nivel de la luz del ventrículo, y las que se ven están asociadas a los cilios.

En las preparaciones pertenecientes al otro grupo control de animales tratados con la proteína patrón BSA marcada con oro de 6 nm la cual penetra en las células por pinocitosis, si bien pudimos localizar algunas partículas de oro en la superficie luminal de endotelios, no se encontró ningún fragmento en el interior del citoplasma en ninguno de los niveles examinados en nuestro estudio (Fig 14A).

La figura 14 (B y C) muestra zonas equivalentes de animales tratados con la proteína recombinante  $G\alpha_{i2}$ -miristoilada marcada con oro coloidal. En este caso localizamos múltiples partículas electrodensas en el espesor del tejido cerebral, no observadas en situaciones controles que nos indica por tanto, la internalización específica de la subunidad  $G\alpha_{i2}$  acoplada al oro tras ser administrada *in vivo*.

Así comprobamos una entrada masiva de partículas de oro a nivel de la sustancia gris periacueductal y en las zonas cercanas a los desmosomas, con gran concentración de estas partículas que se adhieren la superficie luminal y a los cilios de ependimocitos periventriculares.

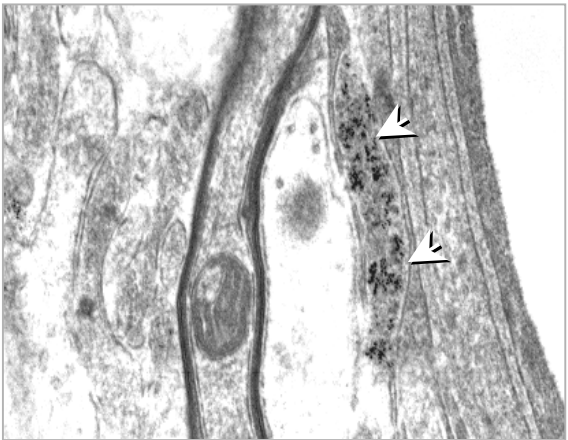
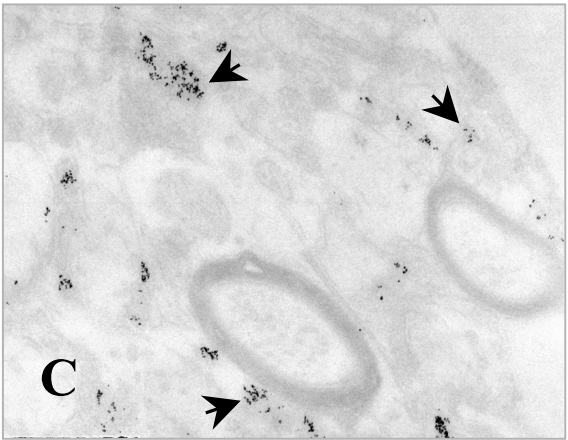
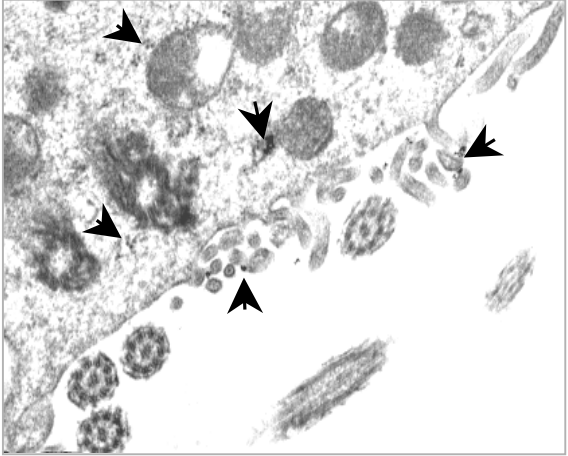
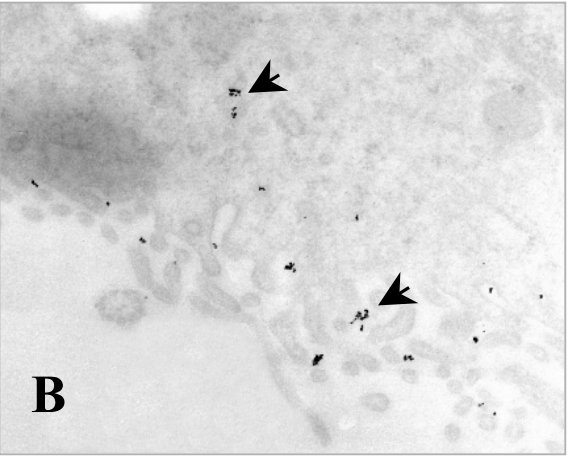
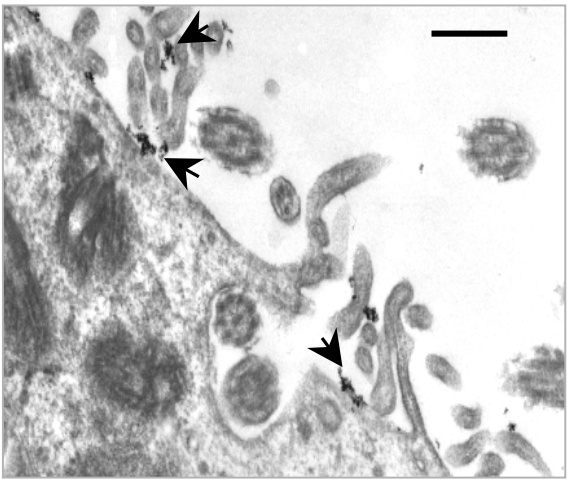
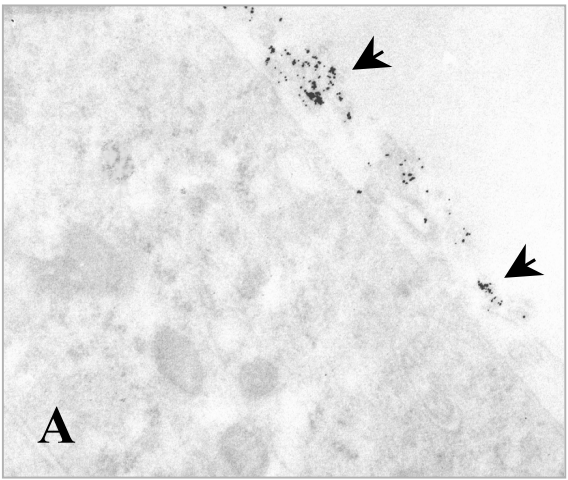
Es interesante indicar que se observaron numerosas partículas de oro bien aisladas o formando cúmulos, en citoplasma asociadas a la membrana plasmática de diferentes procesos de células neurales y formando parte de sinapsis; la entrada de oro, parece darse de forma preferente a través de unas células determinadas, aunque luego se distribuya a las otras a través de las uniones celulares.

Al mismo tiempo pudimos establecer que la entrada de esta proteína al interior de las células neurales, si bien se produce mayoritariamente en los 15 minutos de la administración y no aumenta significativamente en tiempos superiores, si es proporcional a la cantidad administrada, ya que en los cortes correspondientes a animales que recibieron 7  $\mu$ l ( Figura 14 C) pudimos detectar un mayor número de partículas de oro que en los cortes correspondientes a los animales que recibieron tan solo 3  $\mu$ l (Figura 14 B). Es por ello, que en nuestros estudios posteriores elegimos 15 minutos como intervalo óptimo tras la administración de la proteína recombinante, y como ya hemos mencionado, tamaño de partícula de oro 6 nm

### **3.2 Caracterización del mecanismo de entrada de las proteínas $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas al interior celular**

Para analizar el mecanismo implicado en el paso de la proteína recombinante  $G\alpha_{i2}$ -miristoilada al interior celular, trabajamos con un grupo de 15 a 20 ratones, a los que se les administró durante 5 días consecutivos, un ODN generado frente a la proteína Kinasa  $C\beta 1$  impidiéndose así su síntesis.

**Figura 14: Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de ratones tratados *in vivo* con la proteína patrón BSA (A), con 3  $\mu$ l (B), ó 7  $\mu$ l (C) de subunidades  $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas conjugadas con oro coloidal de 6 nm. Como podemos apreciar, la proteína patrón no consigue penetrar y las partículas electrodensas se concentran en el exterior del tejido (A), mientras que  $G\alpha_{i2}$  se internaliza específicamente en el espesor del tejido cerebral. Micrografías de mayor aumento correspondientes a animales que recibieron 7  $\mu$ l de  $G\alpha_{i2}$  marcada (C), nos permitieron localizar esta proteína bien aislada o formando cúmulos en el lumen del ventrículo, cerca de fibras de mielina (izda) y en zonas de glía envolvente (dcha). Todas imágenes de esta figura mostradas a la *derecha*, se realizaron sobre cortes ultrafinos teñidos con acetato de uranilo y nitrato de plomo, según el protocolo indicado en el apartado 2.3.5 de Materiales y Métodos facilitándose así la identificación de las estructuras donde se localizan las partículas electrodensas, mientras que las de la *izquierda* corresponden a cortes paralelos sin tinción para mostrar que las partículas de plomo no han enmascarado al oro y verificar por tanto la autenticidad del marcaje. Escala 0,10  $\mu$ m en A y B, y de 0,18  $\mu$ m en C.**



Como controles llevamos en paralelo animales tratados igualmente durante 5 días consecutivos, bien con suero salino o bien con un ODN de secuencia aleatoria (ODN-RD) que se sabe no interfiere con la síntesis de estas proteínas (Sánchez-Blázquez y col., 1995).

Todas las administraciones se realizaron mediante microinyección en el ventrículo derecho de animales previamente anestesiados con éter. El sexto día,

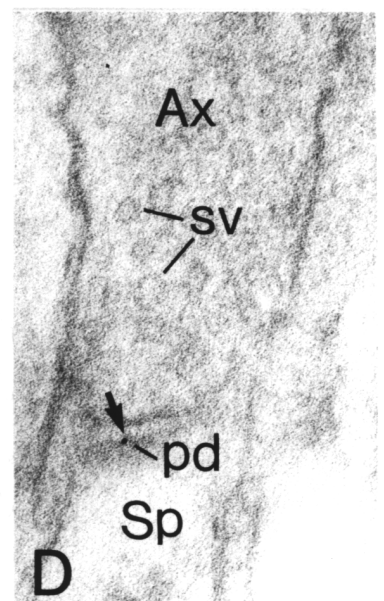
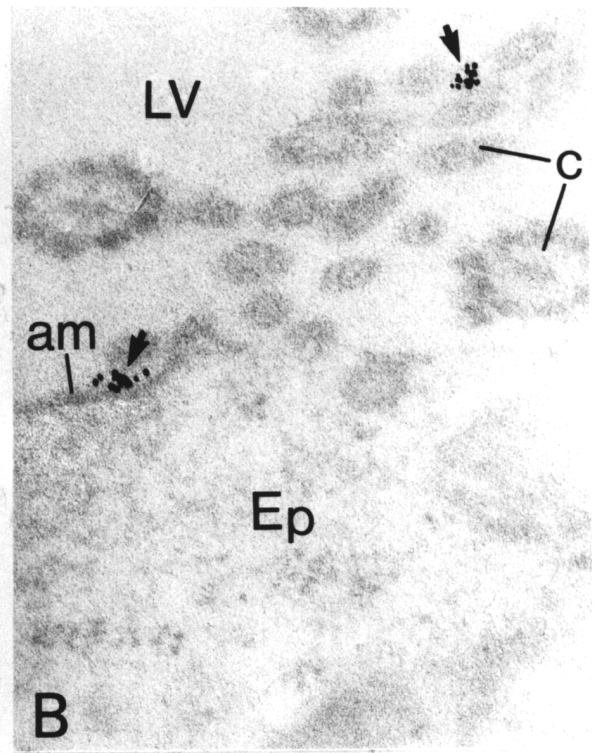
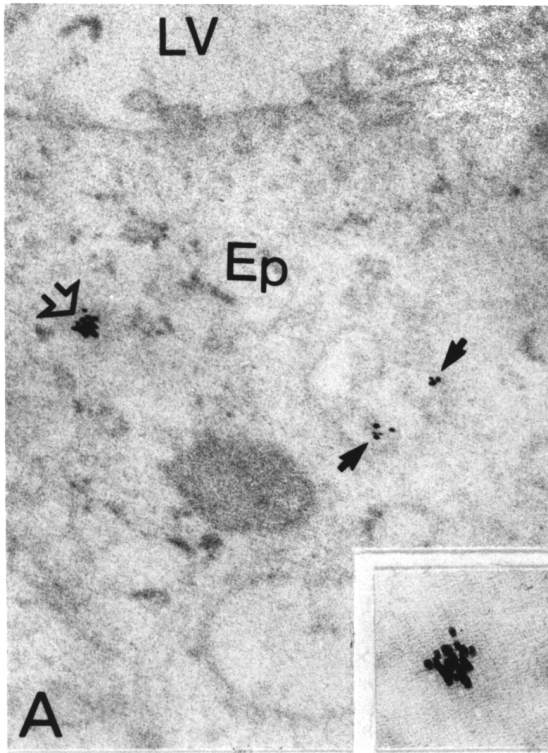


todos los animales recibieron, igualmente vía i.c.v, la proteína recombinante conjugada a oro coloidal de 6 nm, 15 minutos antes de la perfusión intracardiaca para, posteriormente, recoger, fijar, obtener cortes ultrafinos y procesar las muestras según indicamos en los apartados anteriores, almacenándose cuidadosamente hasta su observación en el microscopio electrónico JEOL-1200EX.

Los resultados del análisis de las muestras determinó la selectividad del mecanismo de entrada de las proteínas  $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas al comprobar que en los animales en los que se había impedido la síntesis de  $PKC\beta 1$  se redujo drásticamente la entrada de esta proteína (Figura 15). Las partículas de oro ligadas a  $G\alpha_{i2}$  se localizaron en el exterior de la membrana plasmática distribuidas a lo largo de los cilios y en ninguno de los niveles examinados pudieron detectarse partículas en el espesor del tejido o en el interior de células endodiales.

En las preparaciones controles correspondientes a animales tratados bien con salino, bien con el ODN de secuencia aleatoria (ODN-RD), y por tanto en los que se mantuvo íntegra la estructura de  $PKC\beta 1$ , encontramos tanto a nivel ventricular como en los niveles posteriores analizados, una entrada masiva de partículas de oro acopladas a la proteína recombinante, observando en las zonas cercanas a los desmosomas gran concentración de estas partículas.

Figura 15. Marcaje de células del SNC tras la inyección i.c.v de subunidades  $G\alpha_{i2}$ -conjugadas con oro. En las imágenes correspondientes a un grupo de ratones que habían sido tratados con ODN-RD y que fueron perfundidos a los 15 minutos de la administración de  $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas-oro (A) pudimos localizar partículas electrodensas en el interior de células ependimales (Ep), así como en el lumen ventricular (LV), mientras que en ratones tratados con ODN-PKC $\beta$ 1 (B), las partículas de oro se distribuyen a lo largo de los cilios (C), quedan en la parte externa de la membrana plasmática (am) y no se observa marcaje en ependimocitos. En C y D mostramos como subunidades  $G\alpha_{i2}$  administradas *in vivo* y ligadas al oro alcanzan el neuropilo; con baja magnificación (C) las localizamos bien aisladas o formando pequeñas agrupaciones y en las de alta magnificación (D), las partículas de oro se detectaron en sinapsis de una dendrita con espinas (Sp) e incluso en niveles postsinápticos; como sv se señalan diversas vesículas sinápticas localizadas en esta misma micrografía. Todas las micrografías mostradas en esta figura corresponden a cortes sin teñir. Escala: 0,16  $\mu$ m para A; 0,08 $\mu$ m para D y 0,11  $\mu$ m para B y C.



#### **4. Estudios comportamentales**

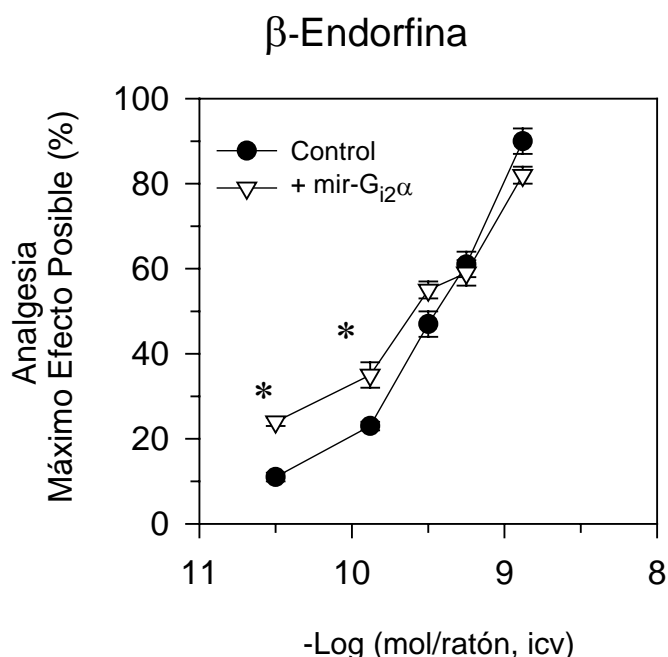
##### **4.1 *Efectos de la administración in vivo de subunidades $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas en la antinocicepción supraespinal evocada por agonistas opioides***

Una vez comprobada la internalización de las subunidades  $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas en el S.N.C de ratón, procedimos a estudiar su posible influencia sobre un parámetro funcional, el modelo de analgesia supraespinal inducida por distintos

agonistas de receptores opioides  $\mu$  y  $\delta$  y  $\alpha_2$ -adrenérgico. Para establecer el grado de analgesia producido por la administración i.c.v. de los diversos agonistas empleados en este estudio, hemos utilizado el test del “tail-flick” con estímulo nociceptivo térmico. Antes de administrar los diferentes tratamientos a los animales se procedió a medir la respuesta basal frente a este estímulo, obteniendo en todos los grupos experimentales (n=10-15 ratones) un valor medio  $\pm$  E.E.M. (error estándar de la media) de  $1,6 \pm 0,2$  segundos. Todas las medidas de analgesia fueron realizadas 30 minutos después de la inyección i.c.v de los diferentes agonistas, que corresponde con el pico de máximo efecto analgésico.

En la primera fase de nuestros estudios de analgesia, hemos analizado los efectos de la microinyección de subunidades  $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas ( $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) 90 minutos antes de administrar dosis crecientes de  $\beta$ -endorfina, opioide endógeno con afinidad por el receptor  $\mu$  y  $\delta$ . Todas las inyecciones fueron unilaterales y en un volumen final de  $4 \mu\text{l}$ /ratón. En paralelo se llevó un grupo control que recibió suero salino.

Como podemos apreciar en la curva dosis efecto representada en la figura 16, la administración de estas subunidades si bien no produce variaciones importantes del efecto analgésico de las dosis altas, si parece aumentar el efecto analgésico inducido por dosis que producen un nivel de analgesia por debajo del 40%. Podemos concluir por tanto, que en condiciones fisiológicas normales la transducción asociada al receptor es óptima y que la aportación de  $G\alpha_{i2}$  exógena no repercute en cambios notables del sistema.



**Figura 16.** Curvas dosis efecto de la analgesia evocada por el agonista opioide  $\beta$ -endorfina en animales controles y pretratados con 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de  $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas administradas mediante microinyección en el ventrículo lateral derecho. El efecto analgésico del agonista se midió a los 30 minutos de la inyección por medio del test del “tail-flick”. Los valores se expresan como las medias  $\pm$ E.S.M. de grupos de 10-15 ratones. Las diferencias significativas se determinaron por análisis de varianza (Anova) seguido del test de Student-Newman-Keuls. El nivel de significación empleado fue  $p < 0,05$ . Se empleó el programa estadístico Sigma-Stat.\*Indica diferencias significativas respecto al grupo control,

#### **4.2 Administración de subunidades $G\alpha_i$ -exógenas en animales “knock-down”**

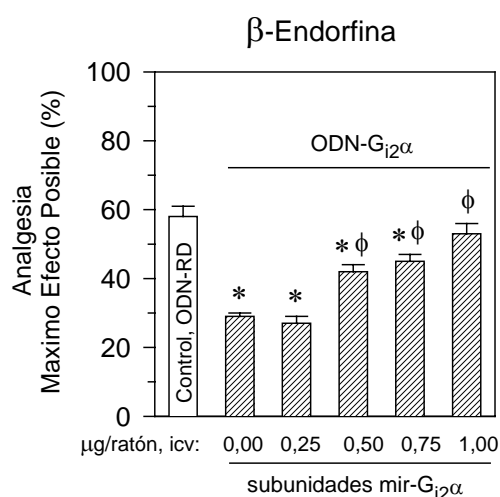
##### **4.2.1 Efectos en animales pretratados con ODN- $G\alpha_{i2}$**

Los datos anteriormente mostrados, nos llevaron a investigar el posible efecto de la administración de  $G\alpha_{i2}$ -exógenas en animales que presentan un deterioro en la respuesta funcional, inducido por el tratamiento subcrónico de ODN

dirigido a una secuencia específica de nucleótidos del ARN mensajero de la proteína  $G\alpha_{i2}$  para reducir la síntesis de dicha subunidad (Garzón y col., 2000). Los ratones se inyectaron durante 5 días consecutivos con dosis crecientes del ODN- $G\alpha_{i2}$ ; el sexto día se les administraron las subunidades  $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas a cantidades crecientes, 30 minutos antes de una dosis fija de 0,6 nmoles/ratón del agonista opioide  $\beta$ -endorfina y posteriormente se midió el efecto analgésico evocado por el agonista mediante el test del tail-flick. En paralelo, llevamos tres grupos de animales controles, un control no tratado para descartar posibles cambios debidos a la manipulación, uno inyectado con salino y otro con una secuencia aleatoria de nucleótidos (ODN-RD), para evaluar el posible efecto tóxico de la administración de nucleótidos sulfotionados en el vehículo.

En los datos recogidos de los grupos controles, no apreciamos diferencias en la potencia antinociceptiva entre el grupo de animales inyectados con salino y el grupo inyectado con el oligodeoxinucleótido aleatorio (ODN-RD), no específico para  $G\alpha_{i2}$ , por ello en la figura 17 hemos representado como único dato control el correspondiente al ODN-RD.

En esta figura podemos observar la reducción del efecto analgésico en los animales tratados con el ODNs así como en estos sistemas  $G\alpha_{i2}$ -deficientes, la administración mediante microinyección en el ventrículo lateral derecho de distintas



dosis de proteína recombinante  $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas, restaura de manera dosis-dependiente, y siempre de forma significativa, la analgesia supraespinal del agonista opioide  $\beta$ -endorfina.

**Figura 17. Recuperación del efecto analgésico de  $\beta$ -endorfina tras la administración de  $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas en animales con tratamiento subcrónico de ODN-RD (blanco) o con ODN anti- $G\alpha_{i2}$ . Las subunidades  $G\alpha_{i2}$ -exógenas, se administraron en cantidades crecientes 60 minutos antes de la administración 0,6 nmoles/ratón del agonista opioide  $\beta$ -endorfina. El efecto analgésico se midió a los 30 minutos mediante el test del tail-flick. Los valores se representan como las medias  $\pm$ E.S.M. de grupos de 10-15 ratones. Como en los experimentos anteriormente analizados, las diferencias significativas se determinaron por análisis de varianza (Anova) seguido del test de Student-Newman-Keuls. El nivel de significación empleado fue  $p < 0,05$ . Se empleó el programa estadístico Sigma-Stat. \*Indica diferencias significativas respecto al control.**

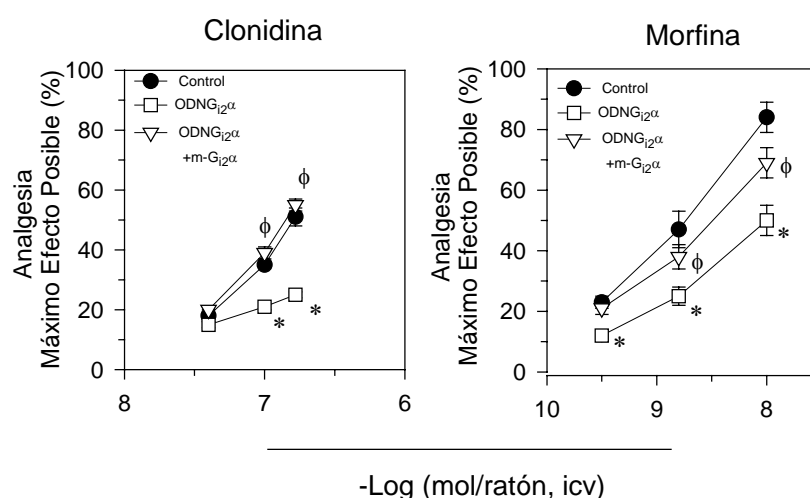
Posteriormente, para confirmar los efectos observados tras la administración de  $G\alpha_{i2}$ -exógenas, llevamos a cabo un estudio comparativo con otros agonistas de receptores acoplados a proteínas G sensibles a PTX. Se emplearon dos grupos, uno inyectado con un ODN-RD, el cual se sabe no interfiere en la síntesis de la proteína y otro grupo con un tratamiento subcrónico de ODN- $G\alpha_{i2}$  siguiendo para ello, la misma pauta de administración anteriormente detallada; este grupo nos daría información sobre los efectos del ODN en la analgesia supraespinal evocada por los agonistas opioides y no opioides empleados en este estudio.

Otros grupos llevados en paralelo e igualmente tratados, recibieron además 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l de la proteína recombinante  $G\alpha_{i2}$ -miristoilada, 90 minutos antes de la administración de clonidina, un agonista presináptico del receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico, o



del alcaloide morfina, agonista del receptor opioide  $\mu$ , midiéndose el efecto analgésico a los 30 minutos de dicha administración mediante el test del tail-flick.

Los datos así obtenidos (Fig 18) muestran al igual que ocurriera en el caso anterior, como en los animales que habían recibido el tratamiento subcrónico con el ODN- $G_{\alpha_{i2}}$  se produce una bajada significativa del efecto analgésico producido por ambos agonistas. Esta disminución del efecto analgésico se recupera tanto en el caso de clonidina como para morfina, en los animales a los que se les administraron las subunidades  $G_{\alpha_{i2}}$ -exógenas, llegando a alcanzar los niveles controles.



**Figura 18.** Efecto de subunidades  $G_{\alpha_{i2}}$ -miristoiladas administradas in vivo sobre la analgesia evocada por diferentes agonistas en ratones “knock-down”. Los distintos grupos de animales recibieron 4 $\mu$ l de  $G_{\alpha_{i2}}$  (0,1 $\mu$ g/ $\mu$ l) 90 minutos antes del tratamiento

con clonidina o morfina. El efecto analgésico se midió a los 30 minutos mediante el test del tail-flick. Los valores se representan como las medias  $\pm$ E.S.M. de grupos de 10-15 ratones. Las diferencias significativas se determinaron por análisis de varianza (Anova) seguido del test de Student-Newman-Keuls, según indicamos en el apartado 5 de Materiales y Métodos. El nivel de significación empleado fue  $p < 0,05$ . Se empleó el programa estadístico Sigma-Stat. \*Indica diferencias significativas respecto al control.

#### ***4.2.2 Efectos de la administración de subunidades $G_{\alpha i}$ -exógenas en animales tratados con PTX***

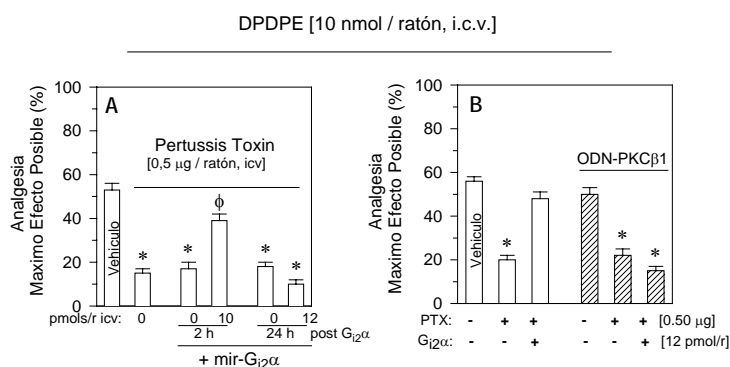
En este apartado de estudios comportamentales mostramos los resultados obtenidos tras la administración de proteínas recombinantes  $G_{\alpha_{i2}}$ -miristoiladas en animales en los que se ha provocado un deterioro, en la función de las proteínas G mediante la administración de una dosis única de PTX, toxina bacteriana que cataliza la ribosilación en un residuo cisteína del C-terminal de subunidades  $G_{\alpha i}/G_{\alpha o}$  impidiendo la regulación de la  $G_{\alpha\beta\gamma}$  por el receptor y bloqueando así la antinocicepción (Sánchez-Blázquez y col., 1988).

La toxina (0,5  $\mu$ g/ratón) se inyectó vía i.c.v a grupos de 10-15 ratones; al sexto día de este tratamiento, se procedió a medir mediante el test del tail-flick, el efecto analgésico producido por 10 nmoles/ratón de DPDPE, agonista del receptor opioide  $\delta$ , administrados igualmente vía i.c.v.

Como podemos apreciar en la figura 19, PTX disminuye en un 40% el efecto antinociceptivo del agonista DPDPE. Para observar si esta bajada del efecto analgésico era recuperada por  $G_{\alpha_{i2}}$ -miristoiladas exógenas, se administraron 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l de estas subunidades a otro grupo de animales pretratados con PTX, 2 horas ó 24 horas antes de recibir el agonista DPDPE. En animales que recibieron las

proteínas  $G\alpha_{i2}$  2 horas antes, el DPDPE recupera su actividad antinociceptiva mientras que en los animales que habían recibido esta proteína 24 horas antes del agonista opioide no se observa esta recuperación, debido posiblemente, a que la presencia de PTX causa la inactivación el efecto de las  $G\alpha_{i2}$  administradas.

En función de los resultados obtenidos en los estudios estructurales, procedemos por último a ver el efecto debido a una bajada de  $PKC\beta1$ . Así, esta recuperación de la función promovida por la administración de subunidades  $\alpha$  de las proteínas G, tras el deterioro funcional provocado por PTX no se detecta si los animales han tenido previamente un tratamiento subcrónico con ODN frente a  $PKC\beta1$ , lo que indica la implicación directa de esta proteína en el mecanismo de entrada de subunidades  $G\alpha$ -exógenas (fig 19, B).



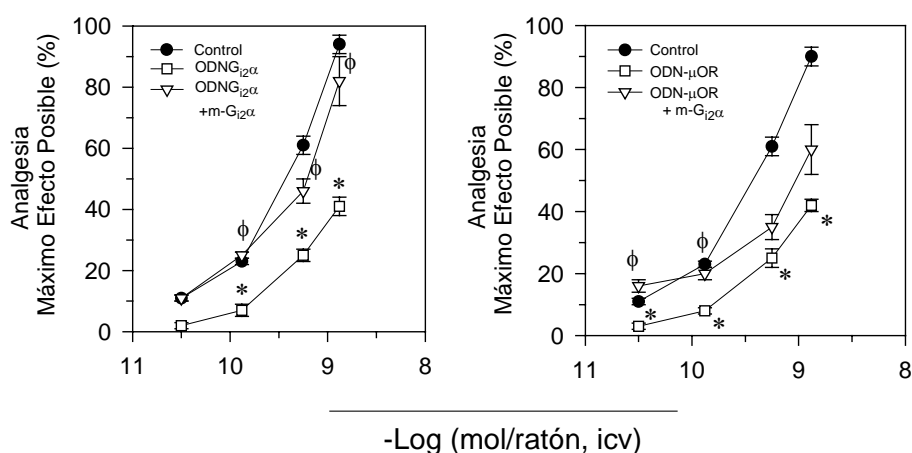
**Figura 19.** Efecto de la administración de  $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas en animales tratados con PTX (A). Implicación de  $PKC\beta1$  en el mecanismo de entrada de estas subunidades (B). El efecto analgésico del DPDPE se midió como en los casos anteriores, a los 15 minutos de la inyección por medio del test del “tail-flick”. Los valores se expresan como las medias  $\pm$ E.S.M. de grupos de 10-15 ratones. Las diferencias significativas se determinaron por análisis de varianza (Anova) seguido del

test de Student-Newman-Keuls, según indicamos en el apartado 5 de Materiales y Métodos. El nivel de significación empleado fue  $p < 0,05$ . Se empleó el programa estadístico Sigma-Stat.\*Indica diferencias significativas respecto al control.

#### 4.2.3 Efectos en animales pretratados con ODN- $\mu$

De forma paralela a los experimentos efectuados en el apartado anterior, realizamos un tratamiento subcrónico durante 5 días consecutivos en dos grupos de 10-15 ratones con dosis crecientes de un oligodeoxinucleótido antisentido esta vez frente a una secuencia específica del receptor opioide  $\mu$ , reduciéndose así la síntesis

### $\beta$ -Endorfina



del mismo.

**Figura 20.** Tras el deterioro provocado por la administración del ODN a nivel del receptor  $\mu$ , detectamos una disminución significativa en el efecto antinociceptivo de  $\beta$ -endorfina respecto al grupo control (ODN-RD). Los datos correspondientes a los animales que recibieron la proteína recombinante  $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas tras el pretratamiento con el ODN- $\mu$ , muestran que en este caso de deterioro a nivel del receptor, estas subunidades  $G\alpha$ -exógenas no son capaces de recuperar el efecto analgésico del agonista. Como en los casos anteriores, las diferencias significativas se

determinaron por análisis de varianza (Anova) seguido del test de Student-Newman-Keuls, según indicamos en el apartado 5 de Materiales y Métodos. El nivel de significación empleado fue  $p < 0,05$ . Se empleó el programa estadístico Sigma-Stat

Como control llevamos un grupo de animales inyectados con un oligodeoxinucleótido de secuencia aleatoria (ODN-RD) y uno de los grupos que había recibido el pretratamiento con el ODN- $\mu$ , al que no se le administraría las  $G\alpha_{i2}$ -exógenas y serviría por tanto como medida de los efectos provocados por el ODN. El sexto día el otro grupo pretratado con el ODN- $\mu$  y el grupo control (ODN-RD), recibieron mediante microinyección en el ventrículo lateral derecho, una dosis única de 4  $\mu$ l de la proteína recombinante  $G\alpha_{i2}$ -miristoilada (0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l), siempre 60 minutos antes de la administración igualmente vía i.c.v de 0,6 nmoles/ratón de  $\beta$ -endorfina, midiéndose a los 30 minutos el efecto antinociceptivo del agonista opioide por el test del tail-flick.

En la figura 20 se muestran los resultados obtenidos, pudiendo establecerse que tras el deterioro provocado por la administración del ODN a nivel del receptor  $\mu$ , se detecta una disminución significativa en el efecto antinociceptivo de  $\beta$ -endorfina respecto al grupo control (ODN-RD). Los datos correspondientes a los animales que recibieron la proteína recombinante  $G\alpha_{i2}$ -miristoilada tras el tratamiento con el ODN- $\mu$ , muestran que en este caso en el que el receptor se ve dañado estas subunidades  $G\alpha$ -exógenas no son capaces de recuperar el efecto analgésico del agonista.

## **5. Cultivos celulares**

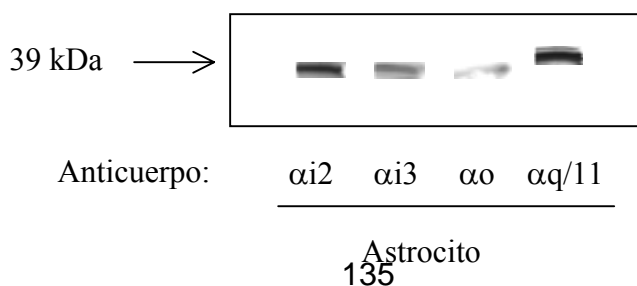
Los resultados hasta ahora expuestos ponen de manifiesto la internalización de  $G\alpha$ -exógenas y revelan la importancia funcional de estas subunidades tras su incorporación a la cascada de señalización. Las aproximaciones para definir los mecanismos por los cuales se produce su captación por células del SNC han revelado su selectividad. Sin embargo con el fin de proceder a una caracterización más completa decidimos poner a punto un modelo de cultivos de células de cerebro de ratón.

Los elementos celulares del SNC, esencialmente neuronas y células gliales son de morfología compleja. Estas células acumulan numerosos receptores en la superficie de sus membranas plasmáticas, establecen entre sí relaciones tróficas, tanto en el sistema nervioso intacto como en el lesionado, de tal modo que pueden especializarse en la detección de mínimos cambios que pueden ser interpretados

como señales de comunicación y que aportan los argumentos esenciales para considerar a estas células fundamentales en la organización de los seres vivos. Por ello, tras caracterizar la presencia de subunidades  $\alpha$  en astrocitos, hemos considerado de especial interés estudiar si se lleva a cabo la internalización de subunidades  $G\alpha$ -exógenas en estas células neurales y profundizar en el significado fisiológico que conlleva.

### **5.1 Caracterización de las subunidades $\alpha$ de las proteínas G presentes en astrocitos de rata:**

Astrocitos obtenidos de corteza cerebral de rata (P0-P1), fueron crecidos sobre placas de Petri de 9 cm estériles en BME/F-10S hasta alcanzar la confluencia (8-10 días), manteniéndose durante este periodo de tiempo en un incubador a 37°C, en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> saturada de vapor de agua. Posteriormente se procedió mediante rascado a recoger las células para su solubilización con SDS al 1%. Seguidamente fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) en un gradiente de 10-20% de acrilamida/2,6% bisacrilamida. Las proteínas fueron transferidas a membranas de difluoruro de polivinilideno de 0,2  $\mu$ m. Posteriormente se realizó el ensayo de inmunodetección con los anticuerpos policlonales frente a las distintas subunidades  $\alpha$  de las proteínas G ( $G\alpha_{i1}$ ,  $G\alpha_{i2}$ ,  $G\alpha_{i3}$  y  $G\alpha_o$ ), observándose bandas inmunorreactivas de 39kDa, que corresponde al peso molecular descrito para estas proteínas, lo que indica su presencia en células astrogiales (Figura 21).



**Figura 21. Western-blotting de solubilizados de fracciones de astrocitos de rata han confirmado que las subunidades  $G\alpha_{i/o}$  de las proteínas G se expresan en células astrogiales y pueden ser reconocidas por anticuerpos específicos  $G\alpha_i$ -selectivos. Proteína total por calle: 80  $\mu$ g**

## **5.2 Captación por astrocitos de IgGs anti- $G\alpha$**

De forma semejante a los estudios llevados a cabo sobre SNC de ratón, hemos comprobado en células astrogiales la internalización de IgGs anti- $G\alpha$  marcadas con fluoresceína.

Así, astrocitos replaqueados sobre cubres de 10 mm de diámetro, colocados en placas de 24 pocillos en un volumen final de 300  $\mu$ l/pocillo de BME/F-1S, se incubaron durante distintos intervalos de tiempo (30 minutos, 1, 2, 6, 8 y 16 horas) en presencia de 1,5  $\mu$ l (0,25 $\mu$ g/ $\mu$ l) de IgGs anti- $G\alpha_{i1}$ , anti- $G\alpha_{i2}$ , anti- $G\alpha_{i3}$  y anti- $G\alpha_o$  marcados todos ellos con FLUOS, siguiendo el protocolo indicado en el apartado 4.1 de Materiales y Métodos. Posteriormente, y tras el correspondiente lavado (PB 0,1M, pH 7,3) y fijación de las células (4% paraformaldehído) para retirar el anticuerpo que no había penetrado al interior celular, se procedió a montar las preparaciones para la observación en el microscopio confocal. Mediante el análisis de los resultados comprobamos la internalización tiempo-dependiente de estas IgGs (datos no mostrados), de tal forma que elegimos las 16 horas como el tiempo de incubación óptimo para realizar nuestros siguientes experimentos. Tras este intervalo de tiempo detectamos una leve señal punteada a nivel del citoplasma de las células incubadas con el anticuerpo anti- $G\alpha_{i1}$ , mucho más intensa en los cultivos correspondientes a la incubación con IgGs anti- $G\alpha_o$ ; en las células incubadas en presencia de IgGs anti- $G\alpha_{i2}$  y anti- $G\alpha_{i3}$ , si bien la señal fluorescente sigue siendo



punteada, se puede observar un marcaje de la totalidad del contorno celular (Figura 22 superior).

A la vista de estas imágenes, podemos confirmar que estos anticuerpos son capaces de incorporarse a las células *in vivo* y de unirse a sus dianas correspondientes, permitiendo establecer que  $G\alpha_{i2}/G\alpha_{i3}/G\alpha_o \sim G\alpha_{i1}$ , se distribuyen de una forma homogénea en el citoplasma. Si bien se ha descrito un mecanismo de activación de estas subunidades en respuesta a factores de crecimiento que lo relacionan con una posible capacidad mitogénica de estas proteínas endógenas, en nuestras condiciones de trabajo con astrocitos mantenidos en un nivel basal, no se produjo en ningún caso el paso de anticuerpos a través de la membrana nuclear, sin embargo es posible que, tras la activación receptorial, o incubaciones en concentraciones superiores de suero, o fuera posible su localización en el núcleo.

### **5.3 Internalización de $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas exógenas**

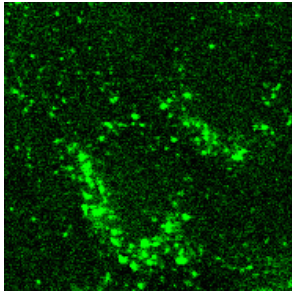
Una vez caracterizada la entrada y unión a sus correspondientes antígenos de IgGs frente a las distintas subunidades  $G\alpha$ , procedimos a caracterizar la internalización de subunidades  $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas exógenas en cultivos de primarios. Cultivos de astrocitos crecidos sobre cubres de 10 mm de diámetro pretratados con poli-L-lisina, introducidos en placas de 24 pocillos, fueron incubados *in vivo* en presencia de 0,5, 1 ó 1,5  $\mu$ l (0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l)  $G\alpha_{i1}/G\alpha_{i2}/G\alpha_{i3}/G\alpha_o$ -miristoiladas-FLUOS en 300  $\mu$ l de BME/F-1S/pocillo durante 1, 2, 4, 6, 8 y 16 horas (figura 22. Tras sucesivos lavados del tratamiento con PB 0,1 M estéril, las células se fijaron de la misma forma que en el caso anterior con 4 % de paraformaldehído y se montaron en portas con PB-glicerol para su observación al microscopio confocal.

**Figura 22. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal correspondientes a la**

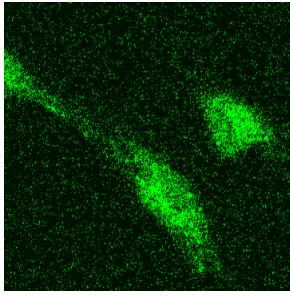
incubación de astrocitos con IgGs anti- $G\alpha_{i1}$ , anti- $G\alpha_{i2}$ , anti- $G\alpha_{i3}$  y anti- $G\alpha_o$  (superior) o con proteínas recombinantes  $G\alpha_{i1}$ ,  $G\alpha_{i2}$ ,  $G\alpha_{i3}$  y  $G\alpha_o$  marcadas con FLUOS. La especificidad de la entrada de esta proteína (verde) para cada tipo celular se muestra en las imágenes obtenidas tras los ensayos de inmunofluorescencia de doble marcaje con GFAP (rojo) en el caso de astrocitos o con NF-L (rojo) en neuronas. Las imágenes mostradas en la parte inferior de esta figura corresponde a la internalización de  $G\alpha_{i2}$ -miristoilada tras distintos intervalos de incubación (1, 4, 8 y 16 horas) en astrocitos, oligodendrocitos y neuronas. La retirada de esta proteína tras los correspondientes tiempos de incubación, provoca la pérdida de adhesión de las neuronas a la matriz, dejando “lechos” vacíos al ser arrastradas en los lavados previos a la fijación.

**IgGs anti-G $\alpha$  -FLUOS**

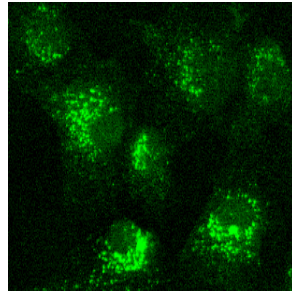
**G $\alpha_{i1}$**



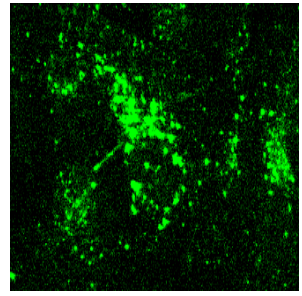
**G $\alpha_{i2}$**



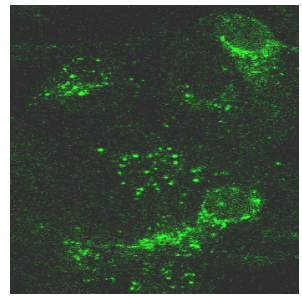
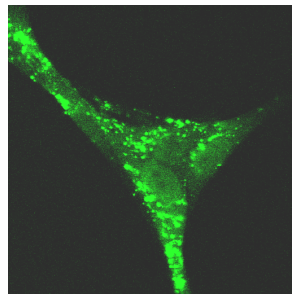
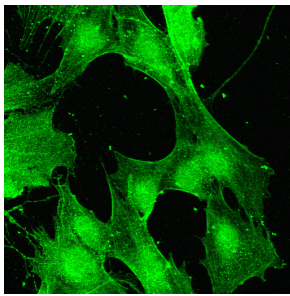
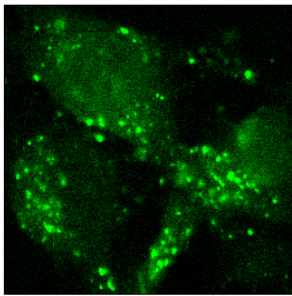
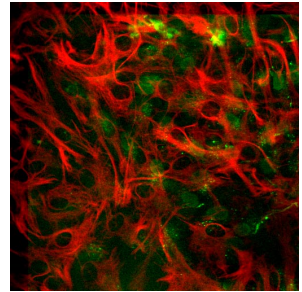
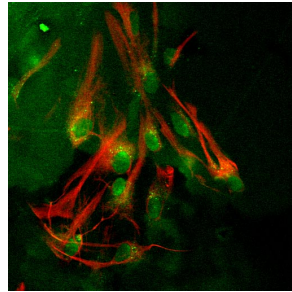
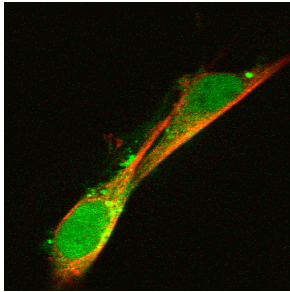
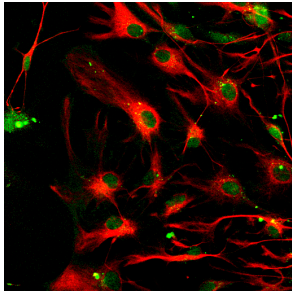
**G $\alpha_{i3}$**



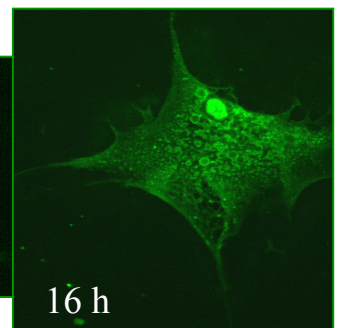
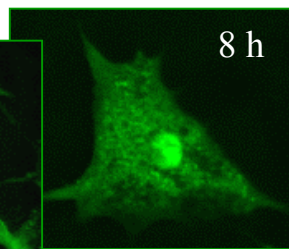
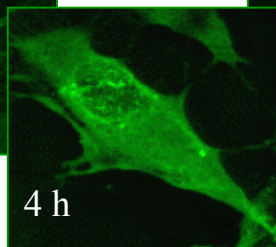
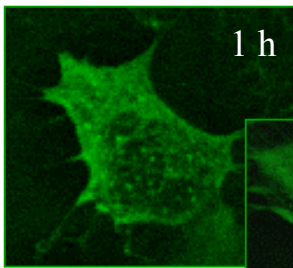
**G $\alpha_o$**



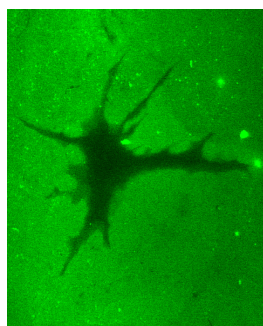
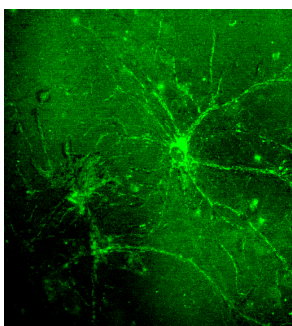
**G $\alpha$ -mir-FLUOS**



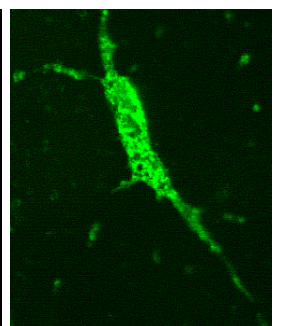
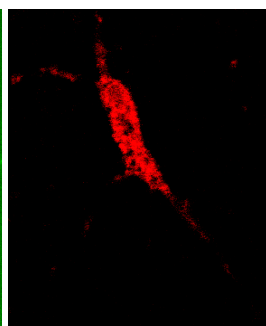
**G $\alpha_{i2}$ -mir-FLUOS**



**Oligodendrocytes**



**Neurons**



En función de la relación de menor cantidad de proteína requerida e intensidad de señal obtenida, elegimos como administración idónea  $1\mu\text{l}$  ( $0,1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) y tiempo de incubación de 16 horas (o/n), a los que corresponden las imágenes mostradas en el panel central de la figura 22.

Los resultados mostraron que  $G\alpha_{i2} \gg G\alpha_{i3} \gg G\alpha_{i0} \gg G\alpha_{i1}$  se incorporan de una forma concentración/tiempo-dependientes y se distribuyen en membrana plasmática y citosol (Figura 22), si bien sólo  $G\alpha_{i2}$  y en menor grado  $G\alpha_{i3}$ ,  $G\alpha_{i0}$ , son capaces de trasladarse desde la periferia hasta núcleo. Las imágenes de la figura 22 (inferior), muestran la internalización en astrocitos de  $G\alpha_{i2}$ -miristoilada marcada (verde) administrada en el medio de cultivo a distintos intervalos de tiempo. Tras 1 hora de incubación, se detecta ya un marcaje uniforme en el citoplasma celular que se intensifica a tiempos mayores. A las 4 horas pudimos al mismo tiempo identificar, un aumento de señal fluorescente en niveles perinucleares, señal, que se condensa proporcionalmente al tiempo de incubación en el interior del núcleo, indicando el paso de esta proteína a través de la membrana nuclear. Así, a las 6-8 horas, la señal correspondiente a  $G\alpha_{i2}$ -Fluos marcaba completamente el núcleo celular y alcanzaba su grado máximo de detección e intensidad tras las 16 horas.

Estos cultivos fueron identificados posteriormente con un 95% de pureza mediante técnicas de inmunocitoquímica y empleando anticuerpos específicos de astrocitos adultos (GFAP: siglas inglesas para la proteína glial fibrilar ácida, un filamento intermedio de 51 kDa muy abundante en estas células gliales) revelados con Alexas-Fluor.

Al mismo tiempo comprobamos que esta traslocación de subunidades  $G\alpha_{i2}$  desde el citoplasma al núcleo si bien es máxima tras 16 horas de incubación, ya a las 2 horas promueve una activación de la mitosis celular, observandose un alto porcentaje de población celular en división. A las 8 horas, y coincidiendo con un aumento de señal fluorescente a nivel nuclear que indica la localización preferente de  $G\alpha_{i2}$ -FLUOS, aumenta el número de células en división siendo a las 16 horas cuando se obtiene el máximo tanto de división, como de intensidad de señal, lo que sugiere que las subunidades  $G\alpha_{i2}$  juegan un papel inductor de división celular. Estos datos son la primera evidencia de la mitogénica señal inducida directamente tras la internalización de exógenas subunidades  $G\alpha$ .

De la misma forma, hemos examinado la presencia de fluorescencia asociada con las subunidades  $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas exógenas en otro tipo de células gliales. En oligodendrocitos, si bien las subunidades  $G\alpha_{i2}$  administradas en el medio de cultivo eran captadas e integradas en el cuerpo celular observandose un marcaje fluorescente uniforme, (Figura 22 panel inferior).

En nuestro estudio examinamos también la presencia de fluorescencia asociada a subunidades  $G\alpha$ -exógenas en cultivos de neuronas corticales de embriones de rata (E15) crecidas sobre cubres recubiertos con poli-L-Lisina, según

indicamos en el apartado 4 de Materiales y Métodos; las células se incubaron in vivo con 1  $\mu$ l (0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l) de subunidades  $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas-marcadas con FLUOS durante 2/16 horas, siguiendo posteriormente el mismo protocolo de fijación y análisis confocal, pudiendo apreciarse que  $G\alpha_{i2}$ -FLUOS se incorporaba independientemente del tiempo en membrana plasmática y en citoplasma.

El tratamiento inmunocitoquímico tras la fijación de las células con anticuerpos frente a neurofilamento L revelado con Texas Red, verifica la especificidad del cultivo. Queremos mencionar que estos cultivos presentaron un rasgo inesperado, aún por analizar, y es que las neuronas en el proceso de lavado y fijación posteriores a la incubación con  $G\alpha_{i2}$ , perdían su adhesión a la matriz siendo arrastradas y dejando sus correspondientes “lechos” detectables en la exploración confocal (Figura 22).

#### **5.4 Caracterización de la entrada de $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas**

##### **5.4.1 Implicación de las caveolas**

Un aspecto esencial de nuestra investigación es la caracterización de las estructuras (proteínas) implicadas en la internalización de las proteínas  $G\alpha$ . Según datos previos, la caveolina, componente mayoritario integrante de las caveolas, interacciona directamente con la subunidad  $\alpha$  de las proteínas G (Li y col., 1996; Couet y col., 1997; García-Cardena y col., 1997; Cameron y col., 1997; Okamoto y col., 1998).

En este trabajo, hemos analizado la participación de las caveolas en los procesos de unión, reconocimiento y posterior internalización de  $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas exógenas en astrocitos. La fase preliminar del estudio consistió en la detección

mediante Western-blotting de la presencia de caveolina en astrocitos (Figura 23 panel superior) empleando distintos anticuerpos dirigidos a secuencias N-terminal (**Transduction** 1:10000 y sc-894 de **Santa Cruz** 1:1000) y C-terminal (sc-7875 **Santa Cruz**). Posteriormente, utilizando técnicas de microscopía confocal confirmamos que la caveolina, principal proteína de las caveolas, es abundante en cultivos confluentes de astrocitos, detectandose una fuerte señal punteada que se distribuye a nivel de la membrana celular de forma organizada. Los resultados mostrados en la figura 23 A, corresponden a un protocolo de inmunocitoquímica convencional como el indicado en el apartado de Materiales y Métodos de este trabajo, en donde se somete a las células tras el proceso de fijación, al tratamiento con el anticuerpo anti-caveolina 1:200 (**Transduction**) procediéndose posteriormente al revelado del mismo con Alexa-Fluor; de esta forma obtuvimos unas imágenes en donde la caveolina describe con nitidez las estructuras caveolares en la membrana celular.

Las imágenes mostradas en la figura 23 C, corresponden a astrocitos mantenidos durante 24 horas en BME/F-1S que tras el proceso de fijación se les sometió a un doble proceso de inmuno marcaje con anticuerpo anti-caveolina revelado con Alexa-Fluor 594 (C1 y C2) y con el anticuerpo específico de glía anti-GFAP revelado con Alexa-Fluor 488 (C3). En estas imágenes podemos apreciar tanto las zonas de colocación (C) de ambas proteínas en estas células, así como el intenso marcaje caveolar en la superficie de la membrana nuclear (C1) que desaparece en niveles más internos correspondientes al núcleo (C2). Si bien el marcaje obtenido no ofrece la misma nitidez que en el caso anterior, pudimos confirmar que este anticuerpo se une tanto *in vivo* como *in vitro* a caveolina en las células astrogiales. Siguiendo otro protocolo diferente, obtuvimos las imágenes

mostradas en la figura 23 B, donde los astrocitos fueron incubados *in vivo* durante 6 horas, con el anticuerpo anti-caveolina 1:200 (**Transduction**) previamente ligado al fluoróforo (2 horas a temperatura ambiente). Hemos de indicar que en este protocolo incluimos como control células incubadas únicamente con dicho fluoróforo en la misma concentración y periodos de tiempo, recogiendo tras el análisis confocal, ninguna señal en estas células que indicara el marcaje de este compuesto por sí mismo y confirmando por tanto, la especificidad del marcaje del anticuerpo anti-caveolina (imágenes no mostradas). Por tanto, el epítipo de la caveolina es visible desde el exterior en al menos una parte de los astrocitos y resulta ser un candidato como proteína de unión con  $G\alpha$  para su internalización.

Para evaluar la contribución de caveolas en la internalización de la señal mediada por subunidades  $G\alpha$ , distintos cultivos de astrocitos se trataron durante los 15 minutos previos a la administración de las  $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas-FLUOS, con antibióticos poliénicos como filipin III (1.5  $\mu\text{g/ml}$ ) y nystatina (15  $\mu\text{g/ml}$ ), o bien con el glucósido cardiotónico digitonina (100  $\mu\text{g/ml}$ ), todos ellos unen colesterol y lo separan de la membrana causando la desorganización irreversible en la membrana de las caveolas (Bradley y col., 1980; Schnitzer y col., 1994). Como controles se llevaron tratamientos paralelos con  $\beta$ -ciclodextrina (2%) y polimixina-B-sulfato (50  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 30 minutos, los cuales interaccionan con lípidos de membrana, pero no con colesterol, o bien grupos de células que recibieron únicamente 1  $\mu\text{l}$  (0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) de  $G\alpha_{i2}$ -miristoilada unida a una sonda fluorescente para permitir su localización. Mediante microscopía confocal observamos que en los astrocitos tratados con filipin III, nystatina y digitonina durante los 15 minutos previos a la administración de las  $G\alpha_{i2}$ -mir-FLUOS, se atenuaba fuertemente la entrada de esta proteína, mientras



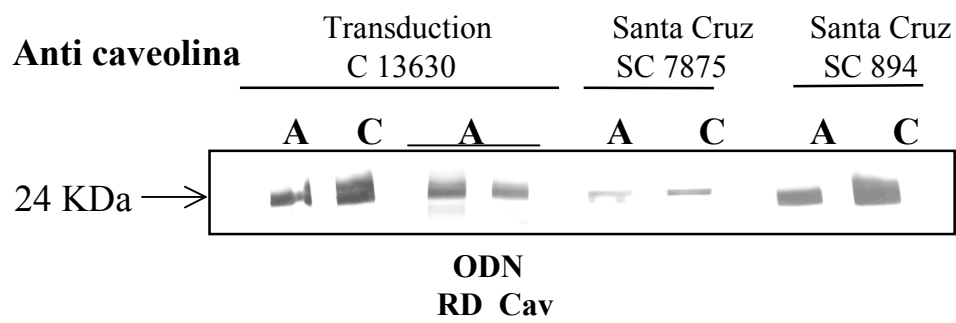
que en los controles o en los pretratados con polimixina-B-sulfato, no afectaban al patrón fluorescente correspondiente a la entrada de las  $G\alpha$ . Los resultados de estos estudios se muestran en la figura 31 junto los datos obtenidos de otros experimentos que complementan esta información, realizados sobre cultivos de astrocitos con los mismos tratamientos.

Con el fin de confirmar nuestros datos en otro grupo de experimentos hemos comprobado que al atenuar *la síntesis* de caveolina mediante la administración de ODNs frente a esta proteína, se dificulta la entrada de subunidades  $G\alpha_{i2}$ -miristoilada marcada. Previamente empleando astrocitos de rata solubilizados con SDS y analizados por SDS/PAGE comprobamos mediante inmunodetección con anticuerpos frente a secuencias N y C-terminales de la proteína su presencia en el astrocito, llevando como controles células endoteliales humanas. También se analizó la selectividad y eficacia del ODN-caveolina con el anticuerpo dirigido a la secuencia N-terminal de la proteína. El ODN-caveolina (Figura 23 E) redujo la intensidad de la señal detectada con respecto al ODN-RD, utilizado como control, el cual no interfiere en la síntesis de dicha proteína y en donde las subunidades  $G\alpha_{i2}$ -FLUOS se internalizan en citoplasma y núcleo (Figura 23 D).

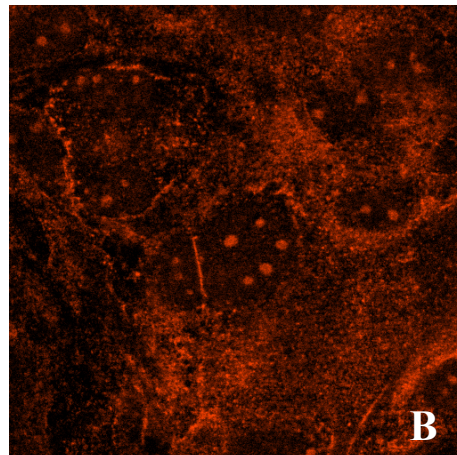
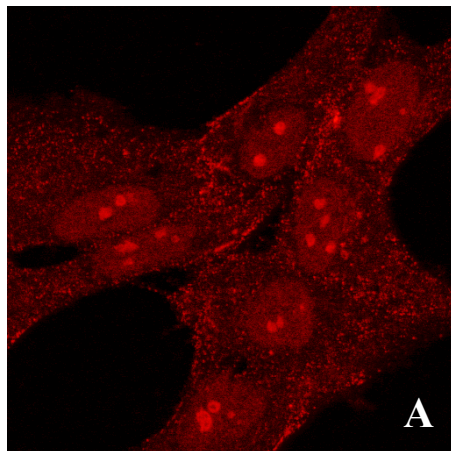
**Figura 23. Inmunodetección de caveolina en astrocitos de rata con distintos anticuerpos frente a secuencias N y C-terminales de la proteína. Células endoteliales humanas fueron utilizadas como control. La eficacia y selectividad del tratamiento con el ODN-caveolina, fue comprobada con el anticuerpo N-terminal de la proteína.**

**Inmunocitoquímica *in vitro* (A) o *in vivo* (B) de astrocitos con anticuerpo frente a la secuencia N-terminal de caveolina (1:200), revelado con Alexas-fluor 596 (1:1000). Posteriormente y para comprobar la especificidad del inmunomarcaje en estas células gliales, se ha realizado un doble marcaje con GFAP (1:500)-Alexa-fluor 488 (verde) empleando para ello técnicas de inmunofluorescencia y siguiendo el protocolo indicado en el apartado 4 de Materiales y Métodos (C); C1 y C2, corresponden a dos**

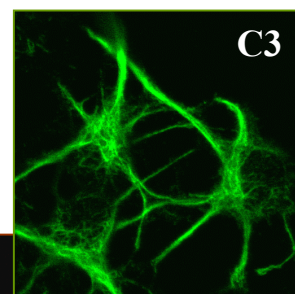
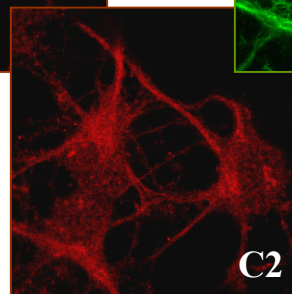
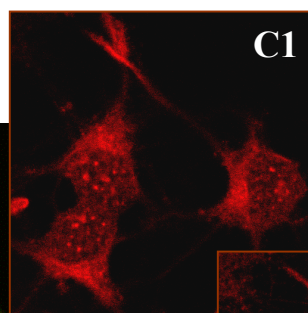
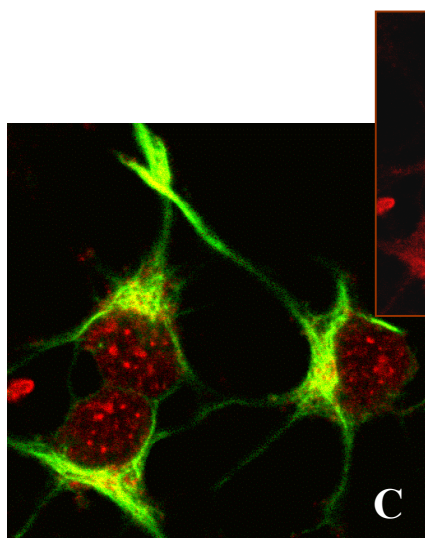
planos transversales consecutivos de 2  $\mu\text{m}$  de una misma célula. Las imágenes mostradas en la parte inferior corresponden a zonas intracelulares donde colocan las señales obtenidas tras la internalización de  $\text{G}\alpha_{i2}$ -miristoilada-FLUOS (verde) y anticuerpo anti-caveolina revelado con Alexa-Fluor 549 (rojo) en astrocitos tratados durante 3 días consecutivos bien con 0,2 $\mu\text{g}$ /pocillo de ODN-caveolina (E) o de ODN-RD (D).



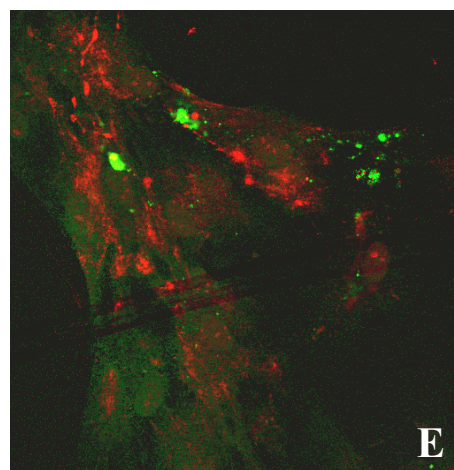
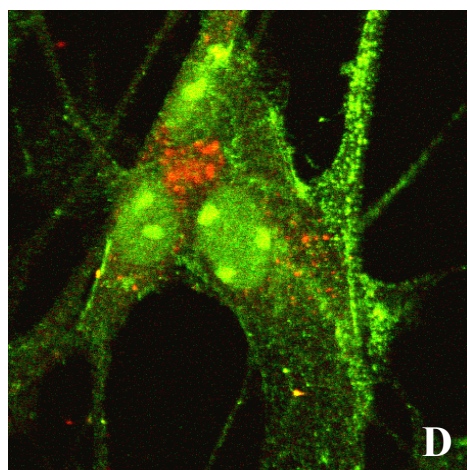
anti-caveolina



GFAP-anti-caveolina



G $\alpha_{i2}$ -mir/anti-caveolina



Para realizar los estudios de inmunofluorescencia hemos seguido el protocolo indicado en el apartado 4.1 de Materiales y Métodos, partiendo de astrocitos crecidos en cubres de 10 mm de diámetro y mantenidos en placas de 12 pocillos en un volumen de 300  $\mu$ l/pocillo BME/F-10S tratados durante 3 días con 0,2  $\mu$ g/pocillo de ODN-caveolina. Como controles se llevaron en paralelo astrocitos tratados igualmente durante 3 días con un ODN de secuencia aleatoria (ODN-RD). Transcurrido este periodo de tiempo, ambos grupos se incubaron durante 16 horas con subunidades  $G\alpha_{i2}$ -FLUOS y, como en los casos anteriores, tras sucesivos lavados con PB 0,1 M, se procedió a la fijación de las células y al montaje de las preparaciones para llevar a cabo el estudio correspondiente.

Los resultados obtenidos tras la exploración con el microscopio confocal, verifican una bajada de la señal fluorescente correspondiente a la internalización de  $G\alpha_{i2}$ , en astrocitos que habían sido tratados con el ODN-caveolina respecto a las células controles que habían recibido el ODN-RD, (Figura 23 E). Estos datos demuestran que es necesaria la integridad estructural de estas invaginaciones de la membrana y la implicación de su componente fundamental, la caveolina en la internalización de proteínas recombinantes  $G\alpha_{i2}$ .

#### **5.4.2 Papel de endocitosis dependiente de PKC en la internalización de $G\alpha$ -miristoiladas**

De forma semejante a lo observado en el SNC de ratón, resultados en

cultivos de astrocitos que seguidamente mostramos, confirman la entrada de  $G\alpha$ -exógenas como un *mecanismo de endocitosis de fase fluída activo con implicación de PKC*.

En los astrocitos en los que la actividad de PKC está alterada por el tratamiento con 1 nM de H7, un inhibidor de PKC y PK dependientes de AMPc, durante los 30 minutos previos a la administración de la proteína  $G\alpha_{i2}$ -FLUOS, se observa un impedimento en la entrada de esta proteína que se manifiesta en las imágenes como una disminución de la señal fluorescente, mientras que el tratamiento de astrocitos con H8 (1nM) , un inhibidor de PKA y PK dependientes de GMP-cíclico, o con otros compuestos que alteran mecanismos diferentes de endocitosis como monensina y colchicina, cheleritina y pentobarbital (todos a concentraciones igualmente 1 nM), no alteran apenas el perfil de entrada respecto a los controles. Las concentraciones de estos inhibidores fueron elegidas en base a estudios previos realizados por Jeffry y col., (1997) y Texeira y Cazaubon (1998).

Las imágenes obtenidas las mostramos en la figura 31, en donde las células controles que recibieron 1  $\mu$ l (0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l) de  $G\alpha_{i2}$ -fluos durante 16 horas, presentan un intenso marcaje distribuído uniformemente en citoplasma e intensificandose la señal en el núcleo, al mismo tiempo que podemos observar un alto porcentaje de células en división dentro del cultivo.

## **6. Traslocación de $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas al núcleo: Estudios de proliferación celular y síntesis de DNA**

La corta duración de la mitosis en comparación con el ciclo celular completo y

la difícil visualización de la condensación de cromatina hacen de métodos basados en estos hechos, un pobre indicador de la capacidad de proliferación

Como hemos indicado en el apartado 4.4 de Materiales y Métodos, hemos empleado para nuestro estudio un método para la medida de la proliferación celular basado en la detección inmunohistoquímica de células en fase S de la mitosis, cuyo ADN incorpora y retiene Ioduro de propidio (IP) y otro, la incorporación de timidina junto con un marcador radiactivo, el cual permite la cuantificación de las células que lo incorporan.

### **6.1 Estudios de proliferación celular**

Para estos estudios hemos empleado cultivos subconfluentes de astrocitos sembrados en una densidad de  $1,5 \times 10^5$  células sobre cubre-objetos de 10mm de diámetro pretratados con poli-L-lisina, manteniéndolas durante 24 horas con BME/F-10S para permitir su adhesión a la matriz. Posteriormente, tras efectuar un lavado con BME//F-0S, se situaron los cubres con las células en placas de 12 pocillos (3 cubres/pocillo) obteniéndose así los distintos grupos, todos inicialmente en las mismas condiciones, sobre los que llevaríamos a cabo nuestro estudio.

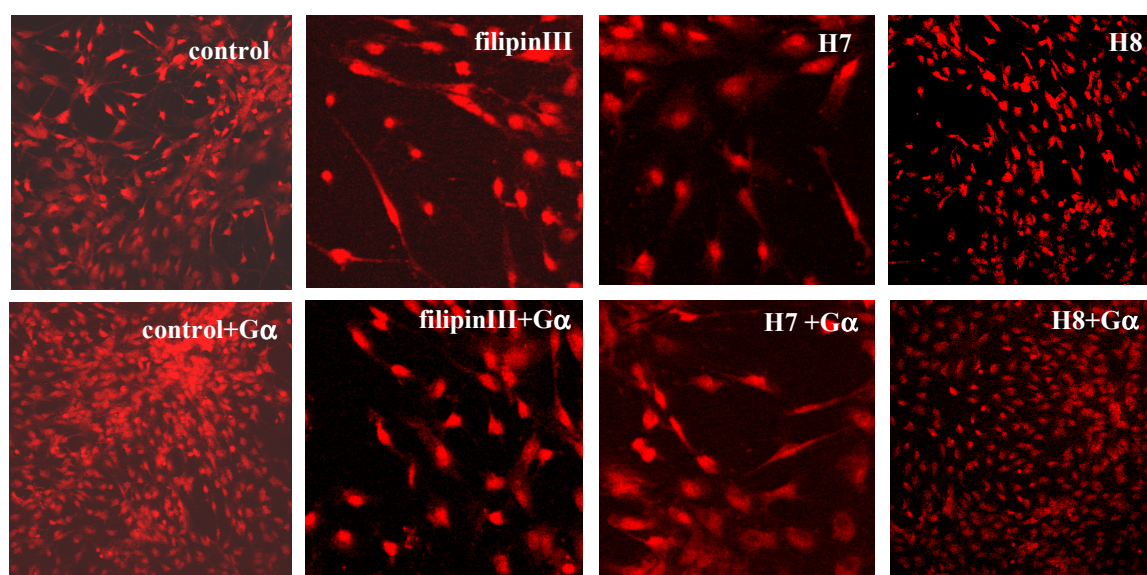
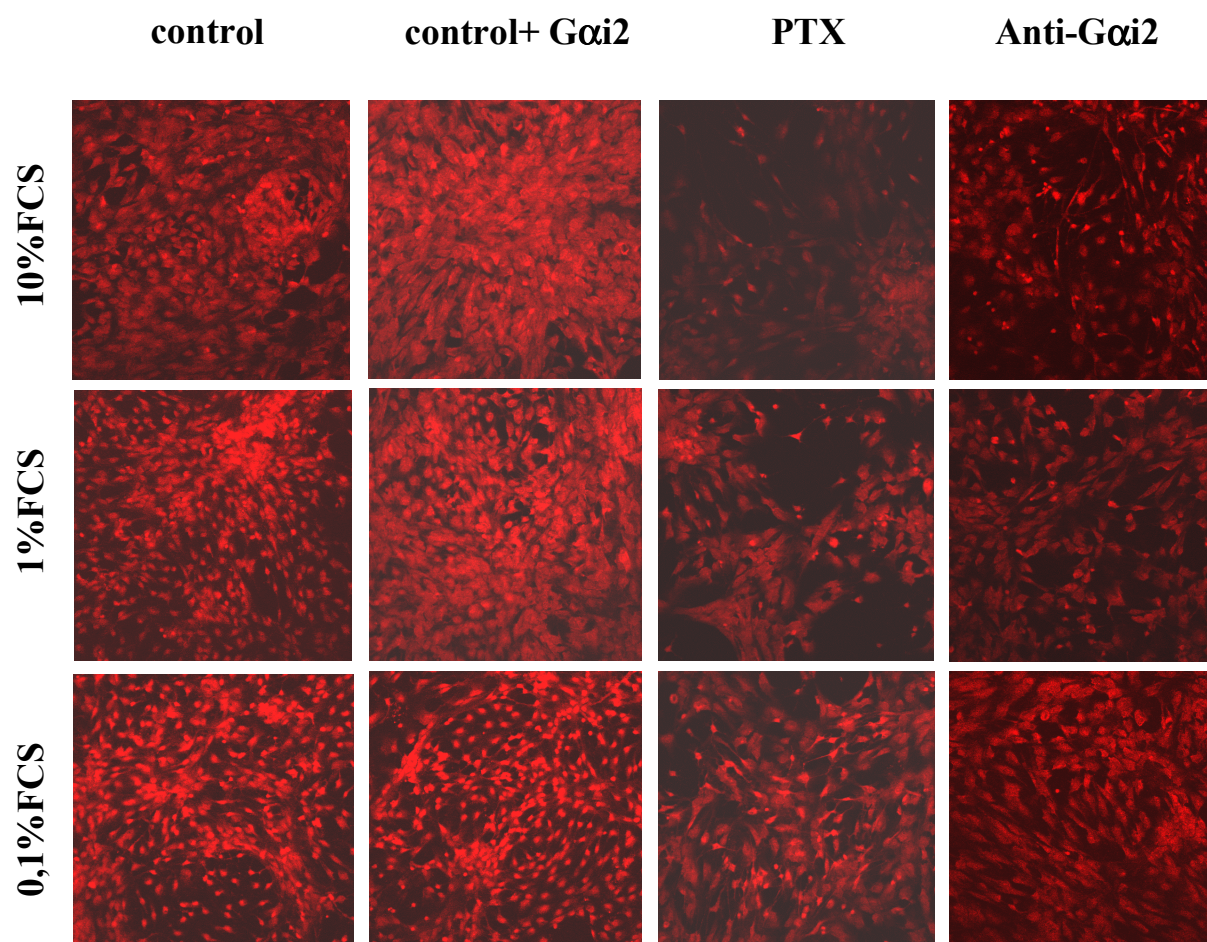
El grupo control se incubó durante 6 horas en 300  $\mu$ l/pocillo de BME con distintos porcentajes de suero 0,1%, 1% ó 10%; a otro grupo además de estos mismos porcentajes de suero se les administró 1  $\mu$ l/pocillo (0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l) de  $G\alpha_{i2}$ ; otro grupo de células fueron tratadas con 0,1  $\mu$ g de PTX o con 0,25  $\mu$ g/ $\mu$ l de anticuerpos anti- $G\alpha_{i2}$ , en 300  $\mu$ l/pocillo BME/F-1S.

En paralelo se llevaron otras células en idénticas condiciones a las detalladas anteriormente, las cuales recibieron igualmente durante 6 horas, BME/F-1S junto con 1 nM de H7 (inhibidor PKC>PKA) ó H8 inhibidor (PKA>PKC) o bien con 1,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de filipin III, todos ellos compuestos implicados en los mecanismos de entrada de subunidades  $G\alpha$ - exógenas.

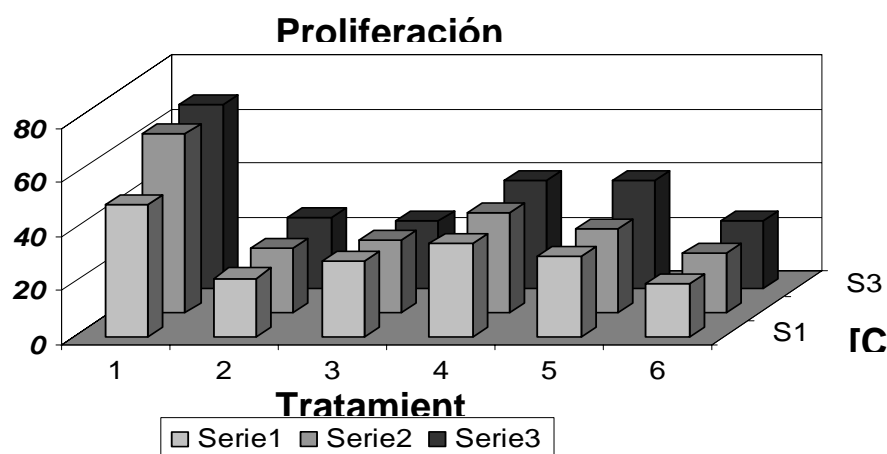
**Figura 24. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de distintos cultivos de astrocitos tratados durante 4 horas bien con 0,1  $\mu\text{g}$  PTX, con el anticuerpo anti- $G\alpha_{i2}$  (0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), con 1  $\mu\text{l}$ /pocillo (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )  $G\alpha_{i2}$  o sin tratar (controles) en distintas concentraciones de suero (0,1%, 1%, ó 10%) Posteriormente se procedió a efectuar sucesivos lavados con PB 0,1M y retirar así los restos del tratamiento, para fijar las células con 4% de paraformaldehído. Los astrocitos fijados sobre los cubres, se incubaron sobre una gota (45  $\mu\text{l}$ ) de IP (1:1000) durante 15 minutos, seguidamente se retiró el exceso de marcador y se montaron sobre portaobjetos de vidrio con tampón glicerol/PB para su observación y obtención de micrografías en el microscopio confocal-panel superior-. En los cultivos controles, el número de células, detectado por la tinción nuclear con IP, aumenta proporcionalmente al porcentaje de suero en el que se realizó la incubación. Los tratamientos con anticuerpos anti- $G\alpha_{i2}$  y en mayor grado con PTX, inhiben la proliferación celular, si bien esta bajada es mas acusada en incubaciones con la toxina a porcentajes mas bajos de suero. En paralelo se han llevado dos series de células tratadas con agentes implicados en los mecanismos de entrada de subunidades  $G\alpha$  (H7 y H8 1 nM por inhibición de PK, o 1,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de filipin III por alterar el colesterol de la membrana caveolar); una de estas series fue incubada posteriormente con la subunidad  $G\alpha_{i2}$ -exógena. Se ha seguido el mismo protocolo de inmunomarcaje nuclear con IP anteriormente indicado. La entrada de  $G\alpha_{i2}$  en astrocitos incubados en BME/F-1S se ve afectada tras tratamientos con filipin III y con H7, detectandose una considerable bajada en el número de núcleos teñidos respecto a**

los controles, mientras que H8 apenas no interfiere. A la izquierda de las imágenes correspondiente a este experimento, se muestran los datos obtenidos sobre cultivos controles en BME/F-1S  $\pm G\alpha_{i2}$ -miristoiladas.





Seguidamente, se procedió tras retirar los distintos tratamientos a fijar las células para mediante técnicas de colorimetría e inmunodetección, marcar el total de núcleos de la población celular con Ioduro de Propidio 0,001% (**Sigma**), marcador fluorescente que detecta ADN tanto de una como de dos cadenas, contiene un grupo plano que le permite intercalarse entre las bases del ADN y tiene un espectro de emisión de 590 nm. Los resultados obtenidos fueron detectados mediante microscopía confocal, cuantificados mediante el programa específico LEICA Q500MC Image Analysis System, y representados en un diagrama de barras (Figura 25).



**Figura 25.** Representación de los datos analizados mediante el programa LEICA Q500MC de las imágenes mostradas en la figura 24 correspondientes a tinción nuclear con IP de astrocitos incubados en presencia de  $G\alpha_{i2}$ -miristoilada, (1) y tratados con H7 1 nM (2), H8 1nM (3), 1,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  filipin III (4), 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  anticuerpo anti- $G\alpha_{i2}$  (5) y 0,1  $\mu\text{g}$  PTX (6) en 200  $\mu\text{l}$ /pocillo del medio de cultivo suplementado con 0,1%, 1% y 10% de FCS (S1-S3). Como podemos observar, en las células controles la proliferación es proporcional al porcentaje de suero en el que fueron incubadas. Los tratamientos con agentes que alteran la endocitosis ó PKC>PKA así como los anticuerpos específicos anti- $G\alpha_{i2}$  no alcanzan valores controles de proliferación celular

El diagrama de barra en el que hemos representado los datos obtenidos mediante microscopía confocal, presenta en dos dimensiones las medias de núcleos marcados con IP, obtenidas a partir de poblaciones con un número semejante de astrocitos crecidas en cubres de 10mm de diámetro, pertenecientes a las imágenes recogidas en la figura 24 superior (astrocitos controles, tratados con 0,1  $\mu$ g PTX o con 0,25  $\mu$ g/ $\mu$ l anticuerpos anti- $G\alpha_{i2}$ , incubados en presencia de  $G\alpha_{i2}$ -miristoilada en BME/F-0,1,1,ó 10-S), y figura 24 inferior (astrocitos tratados con distintos compuestos implicados en endocitosis y alteración de PK).

## **6.2 Síntesis de DNA**

### **6.2.1 Inducción de síntesis de DNA mediada por suero**

Los estudios de incorporación de timidina tritiada, establecieron la relación entre la señal fluorescente observada en el núcleo tras el tratamiento con las distintas subunidades  $G\alpha$  sensibles a PTX y la estimulación de la síntesis de ADN.

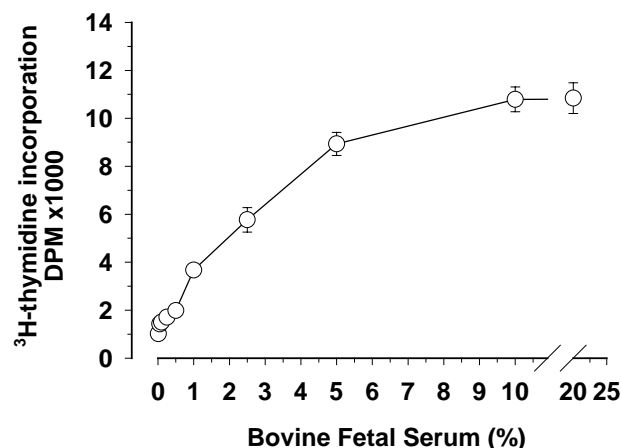
El suero requerido para la adhesión y desarrollo de los cultivos de astrocitos, induce en mayor o menor grado, una activación mitogénica y una división de la cromatina nuclear. Considerando al mismo tiempo que las células de un cultivo proliferante no son sincrónicas y que coexisten en un mismo cultivo células en todas las fases, hemos caracterizado el efecto del suero sobre cultivos de astrocitos sincrónicos y asincrónicos para poder establecer así las condiciones óptimas en este estudio. Para sincronizar el crecimiento de un cultivo, de tal forma que todas las células se encuentren en la misma fase, se requiere mantener las células en BME/F-1S durante 24 horas previas a realizar los tratamientos.

Distintos grupos de cultivos puros de astrocitos sembrados en placas de 96

pocillos en una densidad inicial de  $1,5 \times 10^4$  células/pocillo, se incubaron durante 2 horas con BME/F-10S para permitir su adhesión a la matriz; posteriormente se procedió bien a sincronizar parte de los cultivos (24 horas BME/F-0,1%S) o bien a mantenerlos en BME/F-1S durante el mismo periodo de tiempo (asincrónicos).

Seguidamente se incubaron con BME y 0,1%, 0,5%, 1%, 5%, 10%, 40 % de suero fetal bovino (FCS) junto con un pulso de timidina tritiada (metil- $^3\text{H}$ -timidina, 48 Ci/mmol; **Ammersham**, 0,5  $\mu\text{Ci}$ /pocillo) durante 2, 6 y 16 horas. Tras efectuar tres lavados con PB 0,1 M para retirar el exceso de timidina que no había sido incorporada, añadimos a los distintos pocillos 20  $\mu\text{l}$  de SDS al 0,04% y 200  $\mu\text{l}$  de líquido de centelleo durante 6 horas.

Transcurrido este tiempo, se midió la radioactividad incorporada en un contador de centelleo líquido LKB; los datos obtenidos se analizaron seguidamente con el programa Sigma-Stat estableciéndose que, concentraciones superiores al 1 % de suero inducen síntesis de ADN de una manera dosis dependiente, estableciéndose por tanto esta cantidad, 1% como la basal, a partir de la cual hemos referido nuestros estudios. El máximo de incorporación de timidina-síntesis de ADN, se corresponde con el 10% de suero; cantidades superiores de FCS dificultan la aportación suficiente de otros nutrientes fundamentales para el normal desarrollo. Las diferencias observadas en la incorporación de timidina con los distintos porcentajes de suero, fue semejante en cultivos sincrónicos y asincrónicos, eligiendo los primeros para sucesivos estudios, por ofrecer resultados más evidentes y precisos.



**Figura 26.** Efecto de distintas concentraciones de suero en la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina. Los cultivos de astrocitos sembrados en placas de 96 pocillos en una concentración de  $1.5 \times 10^4$  cel/pocillo, se mantuvieron durante 24 horas en BME/F-0,1S para lograr que todas las células estuvieran en el mismo estadio de división (cultivos sincronizados) y periodo de latencia para incubarse posteriormente con las distintas cantidades de suero y el pulso de <sup>3</sup>H-timidina. Los resultados se muestran en gráficas donde en ordenadas se representan DPM (desintegraciones por minuto) y en abcisas los distintos porcentajes de suero

### 6.2.2 Resultados de la administración de toxina pertúsica y anticuerpos específicos Anti- $G\alpha_{i2}$

Para analizar la posible implicación de las subunidades  $G\alpha$ -sensibles a PTX en los efectos promovidos por el suero, cultivos semiconfluentes de astrocitos sincronizados sembrados en placas de 96 pocillos en la densidad detallada en el apartado anterior, se trataron durante 4 horas con  $0,1 \mu\text{g}$  de PTX, o con  $1 \mu\text{l}$  del anticuerpo anti- $G\alpha_{i2}$  ( $0,25 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) en  $200 \mu\text{l}$  de BME/F- 0,1, 0,5, 1, 5 ó 10 % de suero junto con un pulso de timidina ( $0.5 \mu\text{Ci}/\text{pocillo}$ ) durante 16 horas a  $37^\circ \text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ .

**Figura 27. La activación mitogénica estimulada por el suero en células en cultivo, resulta inhibida en un 25% tras la administración de una dosis única de 0,1 µg/pocillo de PTX y en un 55% en el caso de la administración de 1 µl anticuerpos anti-G $\alpha_{i2}$  (0,25 µg/µl) durante 4 horas. Estos resultados son independientes del porcentaje de suero en el que se mantuvieron las células durante el periodo de incubación.**

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 27, donde en ordenadas se representa el número de desintegraciones por minuto obtenidas (DPM) y en abscisas los diferentes porcentajes de suero y tratamientos. Establecimos que, la mayor lectura recogida para el suero corresponde a porcentajes comprendidos entre el 1 y 10%, si bien las mayores diferencias se establecen entre el 0,1 y el 1%, siendo este último al que hemos referido todos nuestros datos considerandole como basal. Al mismo tiempo observamos que, independientemente de la concentración de suero, la síntesis de ADN en astrocitos queda inhibida en un 25% tras la preincubación de las células con PTX o en un 55% cuando estos cultivos se incubaron en presencia de anticuerpos específicos anti-G $\alpha_{i2}$ .

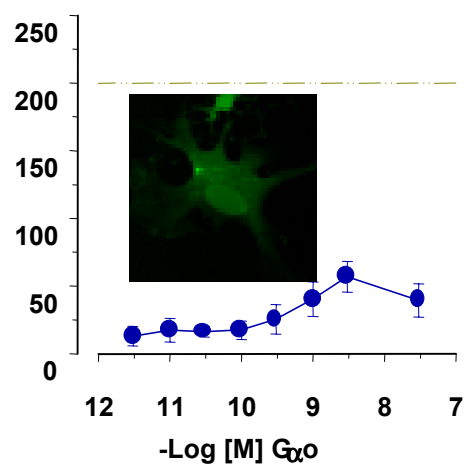
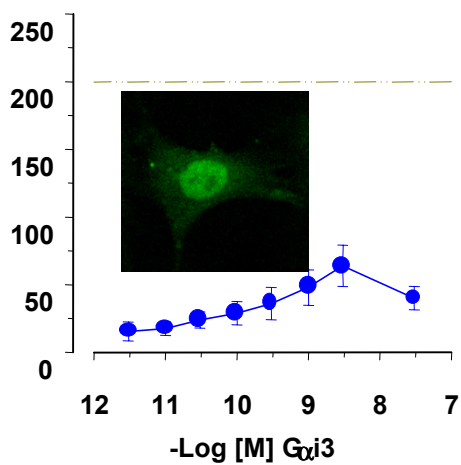
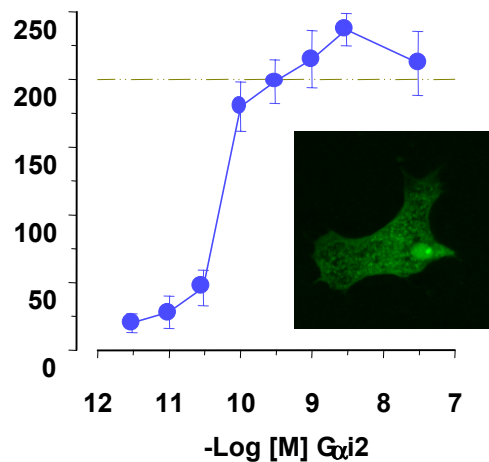
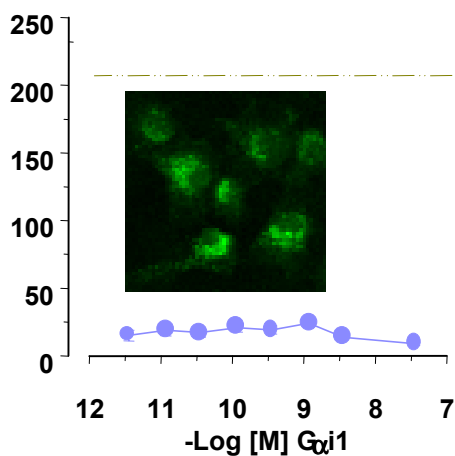
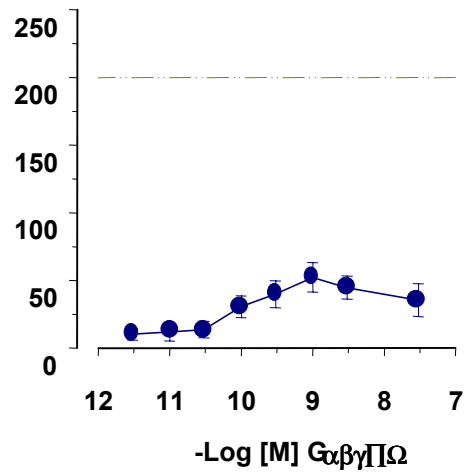
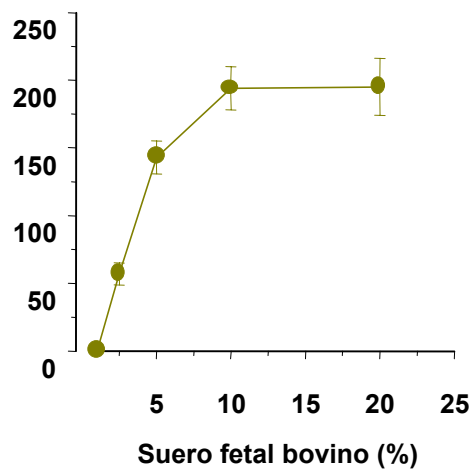
### **6.2.3 Inducción de síntesis de ADN mediada por la administración de**

### ***G $\alpha_{i2}$ -miristoiladas exógenas***

La sensibilidad de proliferación celular inducida por las distintas G $\alpha$ -exógenas sensibles a PTX en presencia de, 1% de suero fetal bovino fue analizada sobre cultivos semiconfluentes de astrocitos sembrados en placas de 96 pocillos ( $1,5 \times 10^4$  cel/pocillo). Distintas concentraciones comprendidas entre 1  $\mu$ M a 10 pM de las distintas G $\alpha$ -miristoiladas fueron adicionadas a cada pocillo junto un pulso de  $^3$ H-timidina (0.5  $\mu$ Ci/pocillo) y manteniendo todo el tratamiento a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 16 horas. Tras efectuar tres lavados con PB 0.1 M para retirar el exceso de timidina tritiada que no había sido incorporada, añadimos a los distintos pocillos 20  $\mu$ l de SDS al 0,04% y 200  $\mu$ l de líquido de centelleo durante 6 horas. Posteriormente, se midió la cantidad del marcador tritio incorporada en un contador de centelleo líquido LKB.

**Figura 28. Evaluación de los resultados obtenidos en los estudios de proliferación celular sobre cultivos de astrocitos tratados con G $\alpha$ -miristoiladas sensibles a PTX, referidos a los datos obtenidos frente a la basal (1% FCS). Cada punto corresponde con la media de los valores por sextuplicado. Para cada gráfica se ha incorporado imágenes correspondientes a cultivos de astrocitos incubados en presencia de las correspondientes G $\alpha$  marcadas con fluorescencia. Como podemos observar, mientras el marcaje correspondiente a G $\alpha_{i1}$ -miristoilada se detecta fundamentalmente a nivel de citoplasma, G $\alpha_o$ <G $\alpha_{i3}$  y en especial G $\alpha_{i2}$ -miristoilada, se internalizan de forma dosis dependiente tanto a nivel citoplasmático como en núcleo promoviendo síntesis de DNA.**

incorporación  $^3\text{H}$ -timidina (% sobre la basal)





Los resultados obtenidos están representados en la figura 28. La figura superior izquierda corresponde a la proliferación promovida por concentraciones crecientes de suero, superiores al 1% (basal); así un suplemento de hasta un 5%

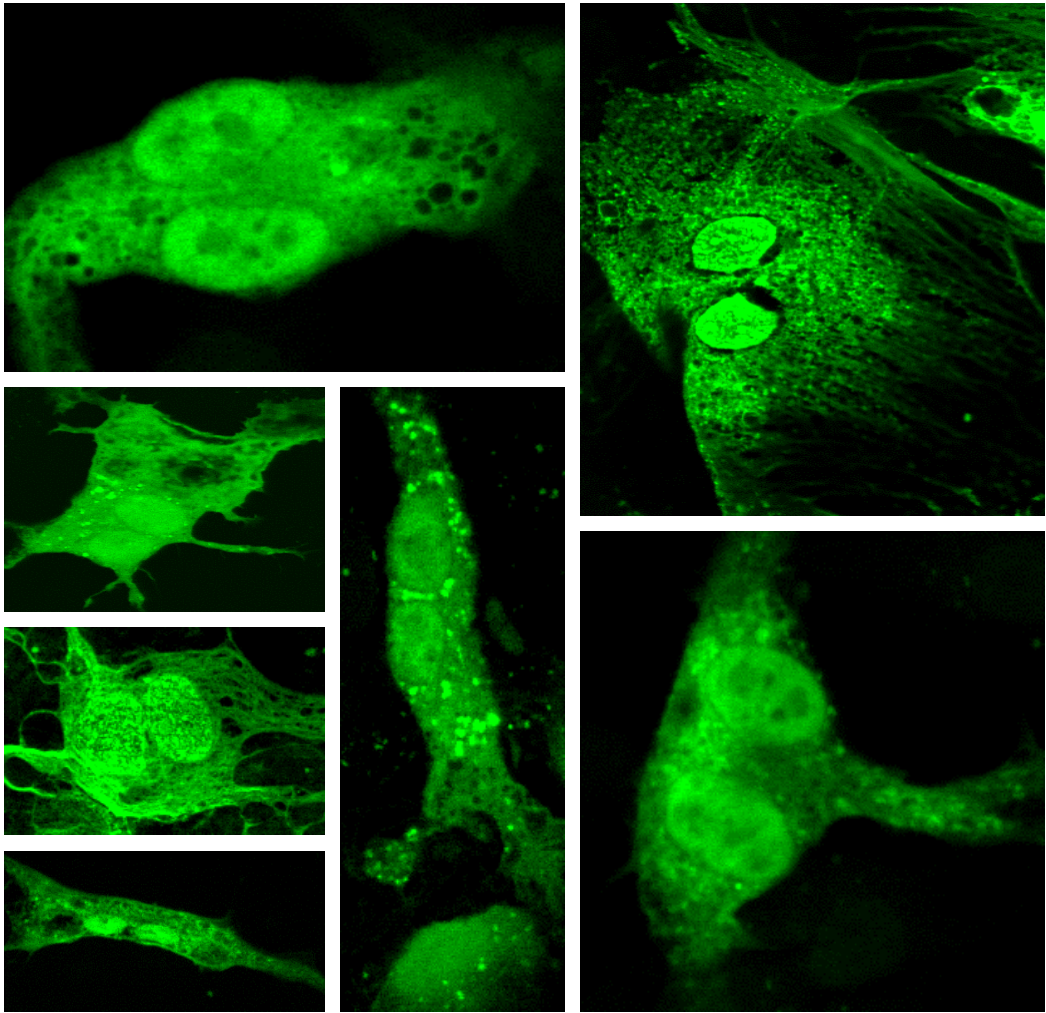
registra 150% de incorporación y un máximo del 200% sobre la basal en porcentajes correspondientes al 10%, a partir del cual la incorporación de timidina se estabiliza. El resto de las gráficas corresponden a curvas dosis efecto de la administración de concentraciones  $\mu\text{M}$  a  $\text{fM}$  de las distintas subunidades  $G\alpha$ -exógenas sensibles a PTX, sobre cultivos de astrocitos, referidas siempre a la basal (1% suero).

Podemos observar como  $G\alpha_{i1}$ , no supera prácticamente los valores basales a ninguna de las concentraciones empleadas; en el resto de las subunidades  $G\alpha$  investigadas, la incorporación de timidina es dependiente de la concentración administrada, ya que mientras que  $G\alpha_{i3}$ ,  $G\alpha_o$  y  $G\alpha_{\beta\gamma}$ , promueven un 50% sobre la basal en concentraciones  $\text{nM}$ , concentraciones inferiores no logran alcanzar estos valores. Sorprendentemente, la incubación de astrocitos en presencia de subunidades  $G\alpha_{i2}$ -exógena indujo de forma dosis dependiente, desde concentraciones  $\mu\text{M}$  a  $\text{nM}$ , una incorporación de timidina marcada, directamente implicada en la replicación cromosómica superior a la conseguida por el suplemento del 10% de suero. En este punto es importante recordar que todos estos datos están referidos al 1% de FCS (basal). Como resultado de las importantes variaciones registradas tras el tratamiento con  $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas respecto a otras  $G\alpha$ -sensibles a PTX analizadas en este estudio, realizamos un seguimiento específico de esta proteína administrando distintas concentraciones comprendidas entre  $\mu\text{M}$ /  $\text{nM}$  de  $G\alpha_{i2}$  (0,02  $\text{nM}$ , 0,2  $\text{nM}$ , 2  $\text{nM}$  y 3 $\text{nM}$ ) en el medio de cultivo enriquecido con cantidades crecientes de suero (0,1%, 1%, 5% y 10%), y a distintos intervalos de tiempo.

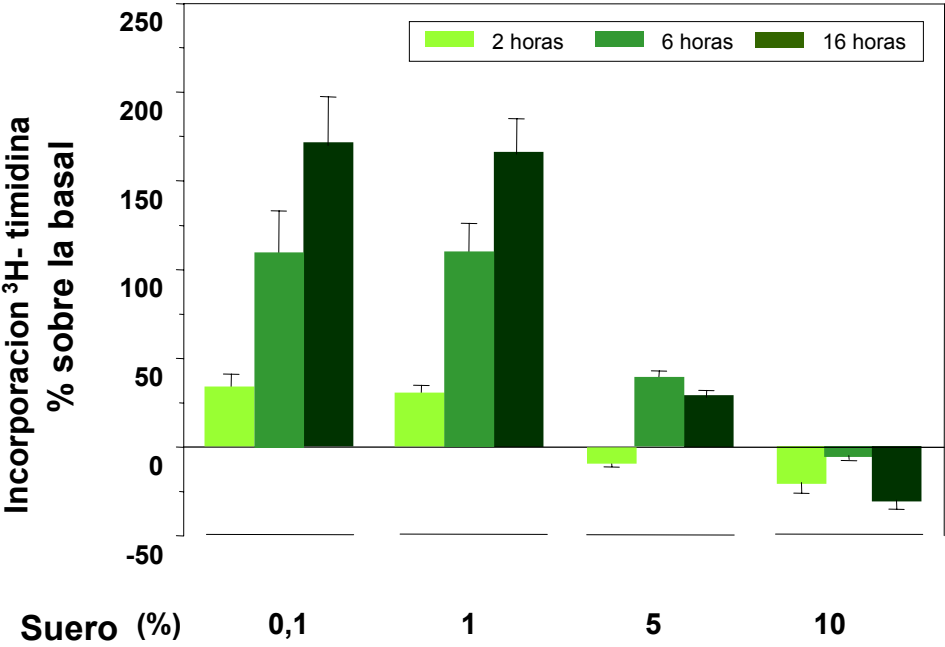
La gráfica representada en la figura 29 muestra los resultados de este estudio, pudiendo comprobar como anteriormente habíamos indicado, que

cantidades inferiores de suero a las requeridas para un mínimo mantenimiento y desarrollo normal de un cultivo astrogial (0,1%), registra tras la administración de concentraciones 3 nM de  $G\alpha_{i2}$ -miristoilada un considerable incremento en la síntesis de ADN respecto incluso, a las inducidas por concentraciones superiores de suero. Al mismo tiempo en esta figura, hemos incluido imágenes obtenidas mediante microscopía confocal, empleando en todas ellas un objetivo 100, en las que mostramos astrocitos en fase de división pertenecientes a la población mayoritaria de un mismo cultivo tras ser incubadas durante los distintos periodos de tiempo y a las diferentes concentraciones de suero indicadas en la gráfica, con subunidades  $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas marcadas con FLUOS. En todas las micrografías podemos apreciar como la internalización de esta proteína alcanza el núcleo en el que se concentra una fuerte señal fluorescente, promoviendo mitosis celular en células mantenidas en un mínimo porcentaje de suero.

**Figura 29. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal (objetivo 40 y 2,41 de zoom), correspondientes a diferentes poblaciones de astrocitos en división tras ser incubados en presencia de  $G\alpha_{i2}$ -FLUOS durante 16 horas. En la parte inferior se muestran los resultados de estudios de proliferación promovidos por esta proteína a distintas concentraciones de suero y tras distintos periodos de tiempo. Las subunidades  $G\alpha_{i2}$ -exógenas incubadas en el medio de cultivo suplementado con 0,1% de suero promueven a tan bajas concentraciones, insuficientes para el normal mantenimiento de las células, un incremento en la incorporación de timidina 25% superior a la basal (1% de suero) tras 2 horas de incubación, alcanzando un 100% a las 6 horas y superando el 150% tras 16 horas de incubación con esta proteína. Como queda reflejado en la gráfica, porcentajes superiores de suero estabilizan la incorporación de timidina en las células llegando a decrecer estos valores hasta un 25% por debajo de la basal, cuando el suplemento de suero fue de un 10% .**



**Gα<sub>i2</sub>-mir (3 nM)**



**6.2.4 Variaciones en la síntesis de ADN, tras bloquear los mecanismos de entrada de proteínas  $G\alpha_{12}$ -miristoiladas**

**6.2.4.1 Bloqueo funcional tras la administración de anticuerpos específicos anti-caveolina**

En apartados anteriores de este trabajo de investigación, hemos comprobado la presencia de caveolina en astrocitos mostrando al mismo tiempo, como el anticuerpo anti- caveolina es capaz de unirse tanto in vivo como in vitro a su correspondiente diana; además hemos analizado la participación de las caveolas en el proceso de reconocimiento y posterior internalización de la proteína  $G\alpha_{i2}$ -miristoilada. Seguidamente mostramos las variaciones en la síntesis de ADN registradas cuando la entrada de estas proteínas exógenas se ve impedida, bien por el bloqueo funcional o de síntesis de caveolina, bien por tratamientos con agentes específicos sobre los mecanismos de entrada. Los resultados obtenidos en cultivos subconfluentes de astrocitos ( $1,5 \times 10^4$  células/pocillo) tratados durante 4 horas, con dos anticuerpos frente a secuencias diferentes de caveolina, secuencia N-terminal (**Santa Cruz** 894) y secuencia C-terminal (**Santa Cruz** 7875) indicaron una bajada correspondiente al 10% de incorporación de timidina respecto a la basal en el caso del anticuerpo dirigido a la secuencia C-terminal de la caveolina, mientras que el que incluye la secuencia N-terminal no afecta a la habitual síntesis de ADN promovida por el vehículo. De la misma forma, en las células incubadas durante 12 horas con 0,2 nmoles/pocillo de  $G\alpha_{i2}$ -miristoilada tratadas previamente con anticuerpos anti-caveolina anteriormente señalados, no alcanza en ninguno de los dos casos los niveles basales de síntesis de ADN a nivel nuclear promovida por  $G\alpha_{i2}$  (Figura 30 inferior).

#### 6.2.4.2 Efecto provocado tras la administración de ODN-caveolina

Los resultados obtenidos en células en las que se impidió la síntesis de caveolina mediante la administración en el medio de cultivo con suplemento de 10% de FCS de un ODN específico frente a esta proteína durante tres días consecutivos, quedan reflejados en la figura 30. En paralelo se llevaron cultivos de astrocitos que recibieron dosis semejantes de un ODN de secuencia aleatoria. Posteriormente se siguió el protocolo habitual para poder efectuar la correspondiente lectura de timidina incorporada a las células en un contador de centelleo, cuyo análisis nos indicó la bajada de síntesis de DNA promovida por el tratamiento con ODN-

caveolina no superando los valores recogidos el 2% de síntesis de ADN, mientras que en las células tratadas con el ODN-RD, se registraron resultados semejantes a los obtenidos en los grupos controles.

**Figura 30. Al interferirse la síntesis de caveolina por el tratamiento con ODN-específico, o bien el bloqueo de su función tras la administración de anticuerpos frente a secuencias N ó C-terminal (Santa Cruz) de caveolina, interfiere en la entrada de  $G\alpha$ -exógenas. Así la incubación de astrocitos junto estas subunidades en 1% de FCS, promueve una incorporación superior al 100% por encima de la basal, mientras que en células con los tratamientos anteriormente indicados no superan en ningún caso los valores basales**

#### *6.2.4.3 Bloqueo por alteración de los lípidos de membrana*

Como hemos mencionado a lo largo de este trabajo, las caveolas, invaginaciones de la membrana plasmática implicadas en la señal de transducción, requieren colesterol para mantener su integridad de tal forma, que tratamientos con antibióticos específicos que actúan sobre este lípido afectan directamente en la transmisión de señales; estos tratamientos repercuten en la entrada de subunidades

$\alpha$  exógenas administradas *in vivo* o en el medio de cultivo de células del SNC y en los efectos que estas promueven tras su internalización. Así astrocitos incubados con 0,3  $\mu$ g/pocillo de filipin III (antibiótico poliénico que actúa selectivamente sobre el colesterol) en BME/F-1S durante 30 minutos a 37°C, provoca un descenso del 20% respecto a la incorporación de timidina tritiada basal (Figura 31), mientras que el efecto no es tan drástico, 15% por debajo de la basal, en astrocitos que recibieron un tratamiento con  $\beta$ -ciclodextrina al 2% durante 1 hora, la cual actúa sobre otros lípidos de membrana diferentes al colesterol (datos no incluidos en la figura). Los resultados obtenidos sobre grupos paralelos de astrocitos incubados en presencia de 0,2 nmoles/pocillo de  $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas, los cuales previamente a esta administración habían sido tratados con filipin III siguiendo el mismo protocolo anteriormente detallado, muestran valores de incorporación de timidina 50 % inferiores a la basal que corresponde directamente al impedimento ejercido por el antibiótico filipin III sobre la entrada de la proteína  $G\alpha_{i2}$ -exógena.

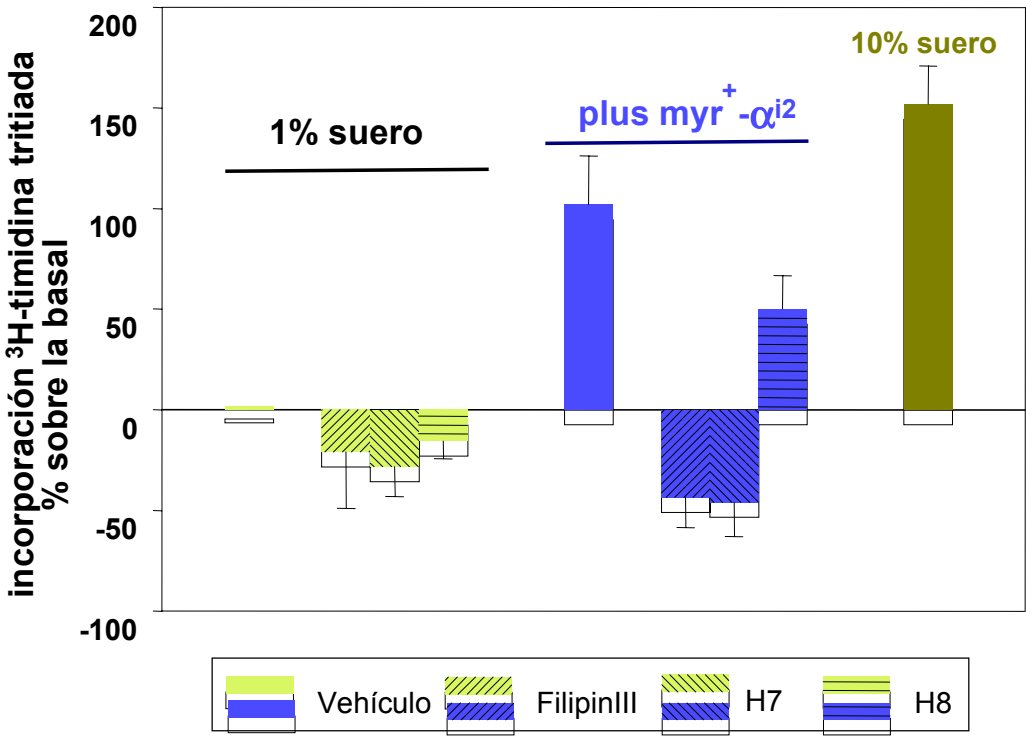
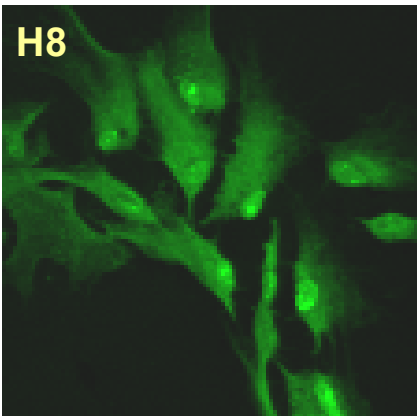
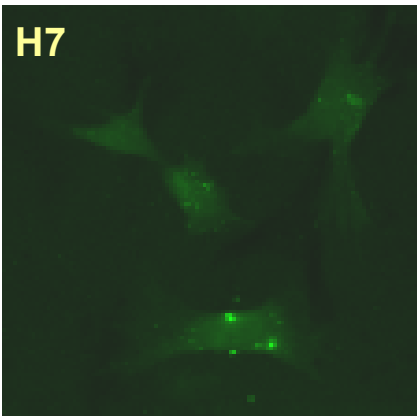
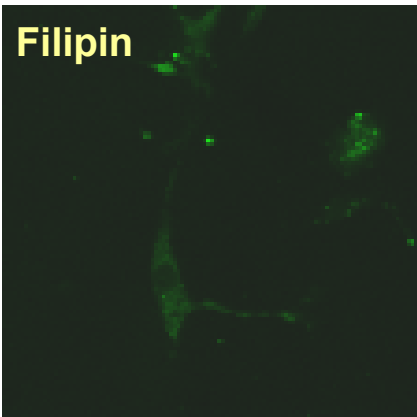
#### 6.2.4.4 *Efecto de la incubación de astrocitos con agentes que alteran la endocitosis*

Tanto los resultados comportamentales sobre animales tratados *in vivo* como los obtenidos sobre cultivos celulares confirman la entrada de  $G\alpha$ -exógenas, como un mecanismo de endocitosis activo con implicación de PKC. En este apartado mostramos los efectos sobre la síntesis de ADN inducida por  $G\alpha_{i2}$ -miristoilada, en astrocitos tratados con agentes específicos que alteran el mecanismo de entrada de esta proteína. Así, la incubación de astrocitos sembrados en placas de 96 pocillos ( $1,5 \times 10^4$  células/pocillo) en 200  $\mu$ l/pocillo de BME/F-1S con H7 1 nM, inhibidor de PKC y PK dependientes de AMPc durante 30 minutos, disminuye en un 30% la síntesis de ADN promovida por el 1% de suero en células controles (basal),



mientras que el tratamiento con H8 1 nM, inhibidor de PKA y PK dependiente de GMP-cíclico, disminuye los valores basales en un 16% (Figura 31).

**Figura 31.** Diversos cultivos semiconfluentes de astrocitos sincronizados, se trataron con 0,3 µg de Filipin III, 1 nM de inhibidores de PK (H8 y H7) en 200 µl BME/F-1S durante 30 minutos. Posteriormente se cambió a medio fresco y se procedió a incubar las células en presencia de 0,2nM  $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas/BME/F-1S junto con  $^3H$ -timidina durante 16 horas, procediéndose posteriormente a la lectura y análisis de los datos obtenidos. En la parte superior de esta misma figura mostramos las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de la respuesta de astrocitos a estos tratamientos. Los resultados del análisis de las muestras determinó la selectividad del mecanismo de entrada de  $\alpha_{i2}$ -exógena, al comprobar que en las células tratadas con H7, inhibidor específico de  $PKC\beta_1$ , y no en las tratadas con H8, inhibidor de  $PKA > PKC$ , se reduce drásticamente la entrada de esta proteína. De la misma forma la bajada de señal fluorescente indica que la internalización de esta proteína se ve en gran medida afectada tras el tratamiento con el antibiótico poliénico filipin III, el cual interfiere en la síntesis del colesterol afectando la estructura caveolar. En la gráfica inferior se muestran los efectos de estos mismos tratamientos en la proliferación celular inducida por  $G\alpha_{i2}$ , alcanzandose valores 20% por debajo de la basal en el caso de pretratamientos con filipin III y hasta 45% inferiores tras interferir la  $PKC\beta_1$ .



Resultados obtenidos en cultivos paralelos mantenidos en BME/F-1S (controles), tratados con H7 ó con H8 1 nM durante 30 minutos e incubados posteriormente durante 16 horas en presencia de  $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas en una concentración de 0,2 nM/200 $\mu$ l BME/F-1S, muestran que esta proteína induce, un 100% de incorporación de timidina directamente implicada en la replicación cromosómica en células controles, logra un 50% tras el tratamiento con H8 mientras que no se registra síntesis de ADN alguna en las células tratadas con H7.

## **7 Estudios funcionales**

### **7.1 Incorporación de $G\alpha_{i2}$ -exógena a la cascada de señalización**

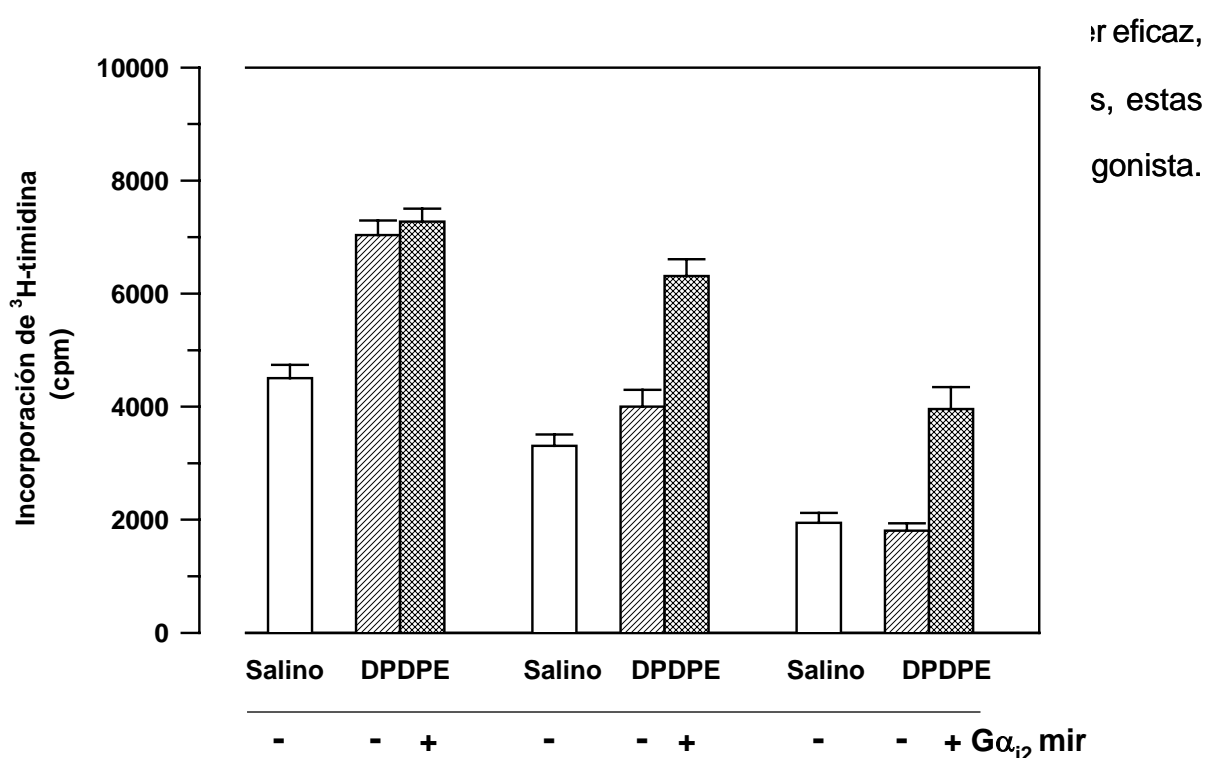
Una vez comprobada la internalización de subunidades  $G\alpha_{i2}$ -exógenas en astrocitos, hemos procedido a investigar su posible acoplamiento a la cascada de señalización y su actividad frente agonistas de receptores G. Como hemos descrito anteriormente, tan solo 2 horas de incubación de astrocitos con 0,2 nM de  $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas en medio suplementados con 0,1% de suero, incrementa la capacidad de replicación cromosómica un 25% por encima de la basal, alcanzando 100% a las 6 horas y superando 150% tras 16 horas de incubación con esta proteína (Figura 29).

Basandonos en estos datos, hemos procedido a tratar durante 4 horas astrocitos sincronizados sembrados sobre placas de 96 pocillos ( $1,5 \times 10^4$  células/pocillo) con 0,1  $\mu$ g de PTX o con 0,25  $\mu$ g/ $\mu$ l de IgGs anti- $G\alpha_{i2}$  en 200  $\mu$ l de BME/F-1S. Como controles llevamos células sembradas en la misma densidad y mantenidas durante 24 horas en BME/F-1S. Posteriormente y tras retirar los distintos tratamientos, incubamos las células en presencia de 0,2 nM de  $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas junto con 0,5  $\mu$ Ci/pocillo de  $^3$ H-timidina. En paralelo llevamos grupos con los mismos tratamientos a los que además, se les administró conjuntamente a las proteínas recombinantes, 100nM del agonista opioide DPDPE. Todas las células se incubaron durante 16 horas a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>, retirandose posteriormente el exceso de timidina tritiada que no había sido incorporada, y completandose el protocolo indicado en el apartado 4.4.1 de Materiales y Métodos para realizar la lectura en un contador de centelleo líquido LKB.

Los resultados obtenidos están representados en la figura 32, donde en ordenadas están indicados los porcentajes de incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina respecto a la basal (1%), y en abscisas la media  $\pm$  SEM de los valores por sextuplicado de cada tratamiento.

Como podemos observar, el efecto proliferativo inducido por el DPDPE sobre los astrocitos, es un 40% superior al obtenido en condiciones basales en donde las células se incubaron únicamente con BME/F-1S. Al mismo tiempo, la presencia de  $\text{G}\alpha_{i2}$  en células controles cuya transducción es óptima, no supone un estímulo proliferativo adicional de este agonista opioide, y los valores recogidos en ambos casos son prácticamente iguales.

El deterioro en la transducción provocado por el bloqueo de  $\text{G}\alpha_{i2}$ -endógenas tras los tratamientos con los anticuerpos específicos anti- $\text{G}\alpha_{i2}$ , disminuye en un 20% la eficacia del suero para activar la síntesis de DNA y en un 45% la capacidad proliferativa del agonista opioide. Las consecuencias son aún más drásticas tras el tratamiento con PTX, en donde prácticamente se anula la activación de síntesis del DNA promovida por el agonista. En estas situaciones en las que la transducción



**Figura 32. Variaciones registradas tras la administración de subunidades  $G\alpha_{i2}$ -exógenas en la estimulación de la proliferación celular promovida por el agonista opioide DPDPE, sobre astrocitos mantenidos en BME/F-1S (controles), o bien en astrocitos en los que se provocó un deterioro en la transducción mediante tratamientos durante 4 horas, con 0,1  $\mu$ g de PTX o con 0,25  $\mu$ g/ $\mu$ l de IgGs anti- $G\alpha_{i2}$**

Estos resultados sobre cultivos celulares concuerdan con los datos de la recuperación del efecto analgésico opioide tras la administración de  $G\alpha_{i2}$ -exógenas *in vivo* en animales que habían sufrido un deterioro en la transducción, y vienen a confirmar la incorporación funcional a la cascada de señalización de subunidades  $G\alpha_{i2}$  de las proteínas G.

Mediante microscopía confocal, hemos procedido posteriormente, a captar a distintos intervalos de tiempo el efecto del agonista opioide DPDPE, sobre las subunidades  $G\alpha_{i2}$ -exógenas previamente internalizadas. Para ello partimos de cultivos de astrocitos sembrados sobre cubres de 10mm, incubados *in vivo* a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> durante toda la noche con  $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas-FLUOS en BME/F-1S. Posteriormente se retiró el medio y el exceso de  $G\alpha_{i2}$  marcadas que no habían sido incorporadas por las células y se trató a los astrocitos con DPDPE 100nM durante 2, 5, 10, 30, 60 minutos y 2 horas. Como controles, se llevaron células que solamente recibieron en el medio de cultivo la proteína miristoilada marcada con fluorescencia (0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l). Posteriormente se siguió el mismo protocolo señalado en los apartados anteriores para la fijación y montaje de las preparaciones con glicerol-PB al 50% facilitandose así su observación en el microscopio confocal.

Las imágenes obtenidas del análisis de estos resultados las mostramos en la parte superior de la figura 33. Los controles correspondientes a la internalización de subunidades  $G\alpha_{i2}$  administradas en el medio de cultivo, muestran una intensa señal tanto a nivel citoplasmático como nuclear. Los astrocitos que tras la incubación con las  $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas fueron tratadas con el agonista opioide DPDPE muestran como a los 2 minutos del tratamiento se produce una difusión de la señal fluorescente desde el núcleo hacia el citoplasma, llegándose prácticamente a ser inapreciable en las imágenes correspondientes a periodos superiores a 30 minutos de incubación con el agonista.

En base a los resultados obtenidos en nuestro estudio y considerando datos de investigaciones recientes que apuntan al incremento de  $G\alpha_i$  y de  $G\beta$  endógenas en la fracción nuclear tras la estimulación con factores neurotróficos, como último punto de este trabajo de investigación, hemos utilizado una aproximación diferente para observar y registrar mediante microscopía confocal la movilidad de las subunidades  $G\alpha_{i2}$ -endógenas en respuesta al agonista DPDPE. Es importante mencionar que se desconoce hasta el momento, si  $G\alpha_i$ -endógena se mantiene unida a  $G\beta$  en la traslocación separándose ya en el interior nuclear, o la activación de los agonistas induce una disociación previa de estas subunidades penetrando por separado en el núcleo.

Partimos nuevamente, de cultivos de astrocitos sembrados sobre cubres de 10mm a los que se trató *in vivo* con DPDPE 100 nM en BME/F-1S durante 30 minutos; como controles llevamos células mantenidas solo en BME/F-1S. Transcurrido este tiempo, se procedió al lavado y fijación de las células con 4% de

paraformaldehído para posteriormente mediante técnicas inmunocitoquímicas proceder a la localización de estas subunidades. Hemos empleado anticuerpos específicos anti- $G\alpha_{i2}$ , o bien anti- $G\beta 1/2$  (ambos a una dilución 1:200), los cuales se revelaron con Alexas-Fluor, 1:1000 siguiendo el protocolo indicado en el apartado 1.3 de Materiales y Métodos.

La exploración confocal nos permitió observar un nítido marcaje punteado en las células controles que confirmaba la presencia de subunidades  $G\beta$  tanto en citosol como en el núcleo. Esta localización nuclear confirma la estimulación por el 1% de suero en el medio de cultivo, el cual hemos considerado a lo largo de nuestro estudio como basal. Las imágenes pertenecientes a células que habían sido tratadas con DPDPE y revelado con el anticuerpo anti- $G\beta 1/2$  nos muestran una mayor intensidad a nivel nuclear respecto a los controles, confirmando la traslocación de estas subunidades tras la estimulación con el agonista.

**Figura 33. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal correspondientes a astrocitos incubados en presencia de 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de  $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas marcadas con fluorescencia durante 16 horas; la intensa señal fluorescente indica la internalización en citoplasma y núcleo de esta proteína administrada en el medio de cultivo. Otros grupos de células recibieron tras la incubación con  $G\alpha_{i2}$ -FLUOS, el agonista opioide DPDPE 100nM durante distintos intervalos de tiempo (2, 5, 10, 15, 30 minutos, 1 y 2 horas). Las imágenes obtenidas tras los 2 minutos del tratamiento con DPDPE (objetivo 40 y 2,10 de zoom) muestran la movilización de  $G\alpha_{i2}$ -FLUOS hacia el exterior celular, que es aún más evidente a los 5 minutos, llegando a ser la señal fluorescente imperceptible a los 30 minutos de dicho tratamiento (Fig. 33 superior).**

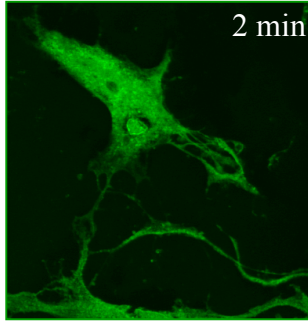
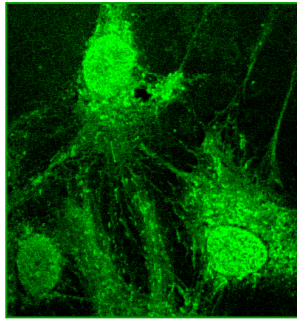
En esta misma figura mostramos al mismo tiempo, imágenes obtenidas mediante microscopía confocal, (objetivo 63 y 1,20 de zoom para las magnificaciones), de la traslocación desde el citoplasma hacia el núcleo de subunidades  $G\alpha_i$  y  $G\beta$  endógenas



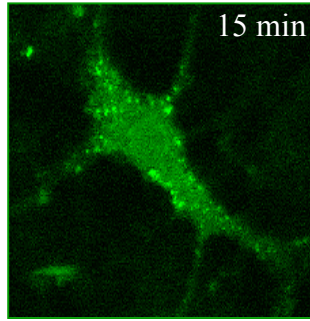
en células controles mantenidas en BME/F-1S y tras la estimulación con DPDPE 100nM. Para la detección de estas subunidades se han empleado técnicas de inmunocitoquímica convencionales, en las que se han empleado anticuerpos anti-G $\alpha_{i2}$  y anti-G $\beta 1/2$  (1:200) revelados con Alexas-Fluor (1:1000)

**Gαi2-FLUOS**

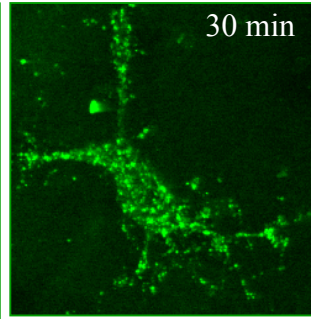
**+100nM DPDPE in vivo**



2 min

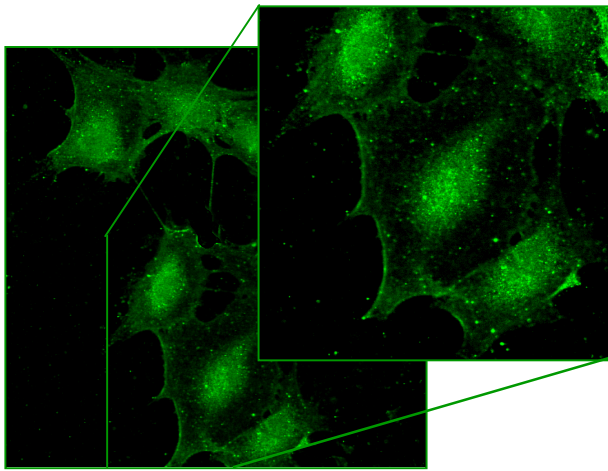


15 min

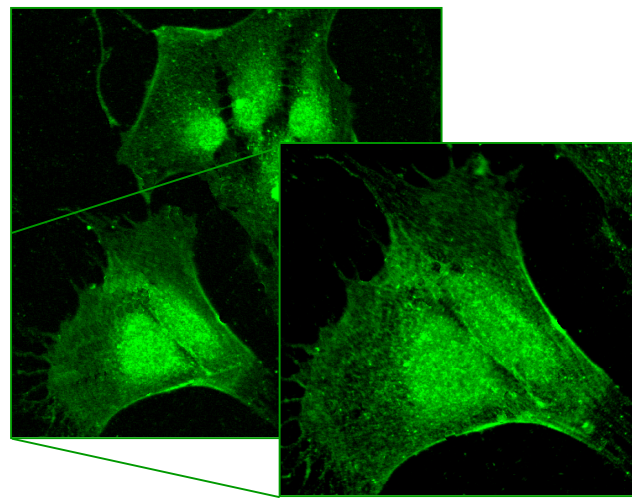


30 min

*Anti β1/2*



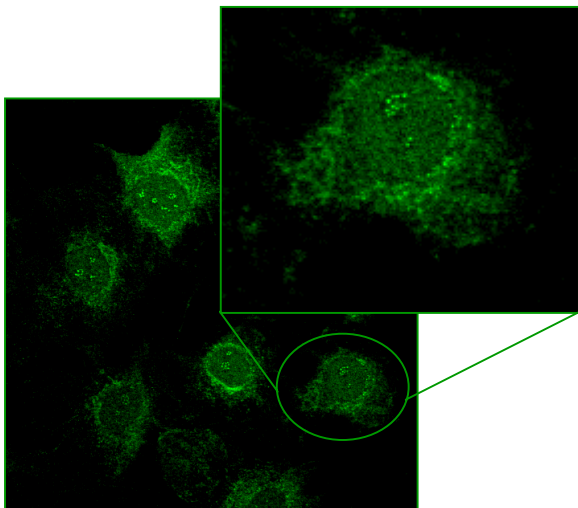
**control**



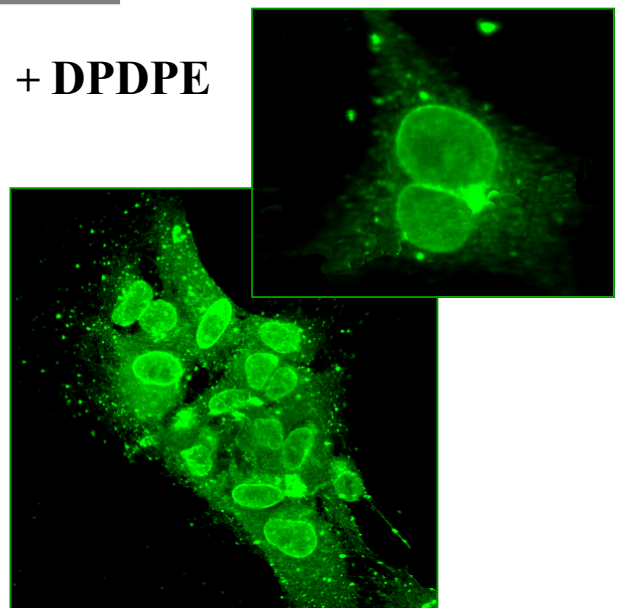
**+ DPDPE**

*Anti-αi2*

**control**



**+ DPDPE**



En la parte inferior de la figura 33, mostramos las imágenes correspondientes a la localización de subunidades  $G\alpha_{i2}$ -endógena con anticuerpos específicos anti- $G\alpha_{i2}$ . Podemos observar como en las células controles se registra, al igual que en el caso anterior, un marcaje tanto citoplasmático como nuclear debido a la activación por el suero (controles). Al mismo tiempo pudimos establecer, que la estimulación por el DPDPE resulta particularmente inductora de la movilización de  $G\alpha_{i2}$ -endógenas, pues las células que fueron tratadas con este agonista, mostraron una fuerte intensificación de la señal fluorescente en la zona perinuclear y núcleo, disminuyendo al mismo tiempo la intensidad de la señal a nivel citoplasmático.



Según la forma en que los neurotransmisores, hormonas y factores de crecimiento transmiten las señales al interior de la célula, se han podido establecer varias familias de receptores. En una de ellas se agrupan los receptores que forman parte integral de un canal iónico como el receptor nicotínico, receptor de glutamato (Cull-Candy y Parker., 1982; Barnard., 1992; Granja y col 1995; Boehm y Huck., 1995). En otra se incluyen aquellas proteínas transmembrana que en la zona extracelular presentan el lugar de reconocimiento del ligando y en la cara interna el lugar enzimático (receptor para el factor de crecimiento nervioso, prolactina,...) (Birnbaumer y col., 1990; Offermans y Schultz., 1994). Finalmente, como ya hemos mencionado en la Introducción, el grupo mas numeroso lo componen los receptores acoplados a las proteínas G en el cual se encuadra el 80% de todos los receptores conocidos, entre ellos los receptores opioides.

Dentro de esta familia, la transmisión de la señal que se produce tras la unión de un agonista a su receptor, implica la activación de unas proteínas en la cara interna de la membrana, las proteínas G, que a su vez son las encargadas de transmitir la información a los correspondientes efectores (Birnbaumer y col., 1990; Gilman y col., 1987; Hille y col., 1992). Teóricamente la forma mas específica y sencilla de transmitir una señal, seria la interacción de un receptor con un único subtipo de proteína G. En esta línea, tras lograr la purificación de los receptores, las proteínas G y los efectores, se abordaron experimentos de reconstitución con la idea de establecer las características de los mecanismos de transducción. Contrariamente a lo esperado se comprobó la ausencia de especificidad (Neer y Clapham, 1988; Jahangeer y Rodbell, 1993; Neer , 1995; Garzón y col., 1995) ya

que un único subtipo de proteína G puede ser activado por varios tipos de receptor y a su vez un determinado receptor es capaz de activar mas de un tipo de proteína transductora (Ueda y col., 1989; Offermans y col., 1994; Law y col., 1994; Lui y col., 1994; Sánchez-Blázquez y col., 1993, 1995; Standifer y col., 1996).

En el caso concreto de los opioides, se ha observado que la unión de un agonista a los tipos  $\mu$ - y  $\delta$ - del receptor opioide, promueve la inhibición de la actividad de la enzima adenilato ciclasa (Childers., 1991; Johnson y col., 1994; Chan y col., 1995) y la regulación de canales de calcio y potasio (Hescheler y col., 1987; Ikeda y col., 1995; Morikawa y col., 1995). Estos efectos están mediados mayoritariamente por la activación de proteínas G del tipo  $G_i/G_o$ , que son sensibles a la toxina pertúsica. En los últimos años se ha visto que los opioides regulan además la actividad de otros efectores, tales como la fosfodiesterasa del AMPc (Law y Loh, 1993), fosfolipasa C (Miyamae y col., 1993; Smart y col., 1994; Tsu y col., 1995), fosfolipasa D y PKC- $\epsilon$  (Mangoura y Dawson, 1993).

En el comienzo de la década de los 90 se realizó un considerable esfuerzo para establecer las relaciones entre receptores y proteínas G en sistemas reconstituidos y en líneas celulares en cultivo (Roerig y col., 1992; Laugwitz y col., 1993; Carter y Medzihradsky, 1993; Moisés y col., 1994; Chan y col., 1995; Ikeda y col., 1995; Morikawa y col., 1995; Tsu y col., 1995; Guzzi y Parenti., 2000). En este campo de investigación se ha recurrido sistemáticamente a diferentes métodos para hacer permeables las células cultivadas e incluso cultivos primarios a ciertas macromoléculas de interés en investigación. Los estudios de reconstitución en sistemas in vitro con receptores opioides y diferentes clases de proteínas G han permitido conocer cuales son susceptibles de regulación por estos receptores, sin

embargo, esta información no es directamente extrapolable a la regulación existente *in vivo*.

La regulación por receptores opioides de la actividad enzimática de baja Km asociada a las proteínas G provocada por ciertos agonistas en membranas, refleja los acontecimientos inmediatos que se producen tras la activación del receptor, por lo que constituye una aproximación complementaria de la caracterización de los tipos de proteínas G. Trabajos previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación valoraron este aspecto sobre fracciones ricas en sinaptosomas (P2) procedentes de cerebro total, o de distintas regiones del sistema nervioso de ratón (Garzón y col., 1994) así como de líneas celulares que expresan el receptor opioide bien de forma espontánea o transfectado. Las diferencias observadas entre los sistemas estudiados parecen deberse a la presencia de diferentes subtipos de proteínas G en las estructuras nerviosas/líneas celulares analizadas.

La disponibilidad de los subtipos de estas proteínas determinará el predominio de efectos farmacológicos de uno u otro tipo de receptor opioide. El número y/o estado funcional de estas proteínas traductoras puede alterarse como consecuencia de la exposición a agentes modificadores de las proteínas G, neuropéptidos reguladores, agonistas opioides y adrenérgicos. La utilización de anticuerpos específicos generados frente a subunidades  $\alpha$  de las proteínas G ha puesto de manifiesto que en la estimulación de la actividad GTPásica mediada por el receptor opioide  $\mu$ , participan principalmente las subunidades  $G\alpha_{i2}$  y  $G\alpha_{x/z}$  (Sánchez-Blázquez y col., 1993; Garzón y Sánchez-Blázquez, 1994; Garzón y col., 1997a; Garzón y col., 1997b), mientras que en la producida por el receptor opioide  $\delta$  parecen implicadas, fundamentalmente proteínas  $G\alpha_{i2}$ ,  $G\alpha_{i3}$  pero no la  $G\alpha_{x/z}$ .

(Sánchez-Blázquez y Garzón., 1993).

Al mismo tiempo, la contribución del Laboratorio de Neurofarmacología del Instituto Cajal, ha sido esencial para lograr la identificación de los subtipos de proteínas G implicadas en la producción de los efectos analgésicos de los opioides (Garzón y col., 1994; Sánchez-Blázquez y col., 1993). En la caracterización de las clases/subclases de proteínas G que participan *in vivo* en un determinado efecto opioide, se han empleado una diversidad de herramientas capaces de alterar selectivamente la función de grupos afines de proteínas G o incluso de un único tipo.

Entre las primeras se encuentran toxinas bacterianas como la pertúsica o la colérica (Przwlocki y col., 1987; Sánchez-Blázquez y Garzón 1988) venenos peptídicos como el mastoparan (Sánchez-Blázquez y Garzón 1994), neuropéptidos como la N-acetil  $\beta$ -endorfina (Sánchez-Blázquez y Garzón 1995); entre los agentes selectivos están los anticuerpos frente a subunidades  $G\alpha$  (Sánchez-Blázquez y Garzón 1993; Garzón y col., 1994; Garzón 1995; Sánchez-Blázquez y col., 1995) y los oligodeoxinucleótidos dirigidos a secuencias génicas de estas subunidades (Raffa y col., 1994; Standifer y col., 1996; Sánchez-Blázquez y col., 1995; Sánchez-Blázquez y col., 1998; Sánchez-Blázquez y col., 1999a, 1999b; Garzón y col., 2000).

En el conjunto de estos trabajos se ha logrado establecer la correspondencia precisa entre los diferentes receptores opioides y aquellas clases de proteínas G que son reguladas en la producción de este efecto. Así, el receptor  $\mu$  regula  $G_{x/z} \rightarrow G_{i2} \rightarrow G_{i3} \rightarrow G_q$ ; el  $\delta$  activa  $G_{i2} = G_{i3} \rightarrow G_{o2} = G_{11}$ , si se admiten los subtipos



del  $\delta$ , aparte de las proteínas G indicadas, el  $\delta_1$  regula a la  $G_{o1}$  y el  $\delta_2$  a la  $G_q$  (Garzón y col., 1998).

Cuando los problemas conceptuales sobre la entrada de ODNs en células fueron superados, ciertos grupos de investigación recurrieron a su uso para reducir la función de las proteínas G en el sistema nervioso (Standifer y col., 1994; Lai y col., 1994; Bilsky y col., 1996; Sánchez-Blázquez y col., 1997). Los resultados con los ODNs frente a las proteínas G reprodujeron con absoluta fidelidad los obtenidos por nuestro grupo con IgGs anti subunidades G. Así, los efectos observados tras la administración crónica de oligodeoxinucleótidos antisentido sobre la analgesia inducida por los receptores opioides  $\mu$  y  $\delta$  en el ratón, presentan el mismo perfil de los resultados obtenidos con los anticuerpos generados frente a las subunidades  $G\alpha$  de las proteínas transductoras (Standifer y col 1994; Lai y col., 1994; Bilsky y col., 1996; Sánchez-Blázquez y col., 1995; Sánchez-Blázquez 1999a; Garzón y col., 2000). Por tanto, podemos asumir que la administración icv de ambas herramientas, ODNs o anticuerpos, produce el bloqueo bien de la síntesis o de las propias proteínas G localizadas en la membrana celular. El efecto reductor sobre la analgesia se observa a las 24 h del tratamiento, continua presente durante 3-7 días y alcanza los valores control entre 10-15 días después de una única administración del anticuerpo.

La especificidad de la respuesta se confirmó mediante la utilización de controles de suero preinmune o suero inmune desnaturizado a 100°C, que no modificaron la analgesia de distintos opioides. Estos resultados sugieren que para recuperar el efecto inicial se precisa la síntesis de *novο* de las proteínas G por la

célula.

Por otra parte, en nuestro laboratorio hemos comprobado que la administración icv en el ratón, durante 5 días consecutivos, de oligodeoxinucleótidos antisentido a los ARN mensajeros de las subunidades  $\alpha$  de las proteínas G, reducen la inmunoreactividad  $G\alpha$  en áreas concretas del sistema nervioso central del ratón entre un 20 y un 60% (Garzón., 1995; Sánchez-Blázquez y col., 1995; Standifer y col., 1996; Shen y col., 1998; Sánchez-Blázquez y Garzón., 1998; Garzón y col., 2000). Esta disminución en el número de proteínas G está relacionada con un descenso significativo de la analgesia inducida por distintos opioides, y que se observa al menos durante las 48 horas posteriores al cese del tratamiento.

Todos estos estudios tienen en común la reducción de los efectos analgésicos de los opioides actuando con toxinas, anticuerpos u oligodeoxinucleótidos sobre la transducción regulada por sus receptores, sin embargo, no se había explorado la posibilidad de aumentar la eficacia de los opioides elevando el tono funcional de las proteínas que transducen sus efectos.

Este ha sido **el primero de los objetivos** del estudio detallado en la Memoria de Tesis, analizar los posibles efectos fisiológicos que se producen tras la administración in vivo de subunidades  $G\alpha$ .

Hemos mencionado en este trabajo que  $G\alpha$  requiere para su funcionalidad enlaces covalentes con grupos miristoilos y/o palmitoilos en las proximidades del grupo amino terminal como enganche hidrofóbico a la membrana (Casey 1994, Deschenes y col., 1990; Resh, 1994; Bigay y col., 1994; Wedegaertner y col.,

1995, Milligan y col., 1995; Lambright y col., 1996). Estudios de mutagénesis revelaron que las miristoilaciones son necesarias para la localización en la membrana de estas subunidades  $\alpha$  y por lo tanto, para su actividad biológica (Gallego y col., 1992; Resh., 1999; Evanko y Wedegaertner., 2000).

Asumiendo estas consideraciones, y teniendo en cuenta que  $G\alpha_{i2}$  participa tanto en los efectos promovidos por los agonistas de receptores  $\mu$  y  $\delta$ , empleados en este estudio, hemos procedido a administrar a ratones vía intracerebroventricular subunidades  $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas marcadas con una sonda fluorescente analizando los resultados obtenidos en diferentes zonas del Sistema Nervioso Central de ratón. Este tratamiento se realizó en animales control o sujetos a tratamientos reductores del tono funcional de la subunidad  $\alpha$  de la proteína reguladora  $G\alpha_{i2}$ .

Como se ha demostrado en este estudio, la administración i.c.v. de subunidades  $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas se sigue de la entrada en las células nerviosas y más importante aún, de su integración funcional como transducción asociada a receptores. Estos resultados indican la posibilidad de restaurar farmacológicamente la calidad de los efectos mediados por receptores G cuando la transducción asociada sufre ciertas alteraciones funcionales.

El paso de anticuerpos anti- $G\alpha$  y subunidades  $G\alpha$  al interior neural no parece deberse a una deficiencia en barreras frente a macromoléculas una vez alcanzan el espacio periventricular, sino que implica unos mecanismos altamente especializados. De hecho los anticuerpos inactivados o no dirigidos a las  $G\alpha$ , no

progresan al interior celular. Esta idea se presenta en este trabajo, en el que se sugiere un reconocimiento previo a la internalización de las IgGs mediante pinocitosis de fase fluída, mecanismo compartido con los ODNs. La miristoilación N-terminal, es esencial para que tras su entrada en la célula, las subunidades  $G\alpha$  puedan integrarse funcionalmente y ayudar a restaurar las funciones perdidas tras PTX u oligos frente a las  $G\alpha$ .

Es interesante la observación de que las  $G\alpha$  exógenas prácticamente no alteran la función normal de los receptores  $\mu$  y  $\delta$  opioide y  $\alpha_2$ -adrenérgico, incluso en situaciones en las que la disponibilidad de uno de estos receptores, el opioide  $\mu$ , se había reducido con el antagonista irreversible  $\beta$ -FNA o con el correspondiente ODN frente a dicho receptor. Por tanto, se sugiere que en situaciones de funcionamiento correcto, la relación receptores-proteínas G debe ser óptima, o no se dispone de  $\beta\gamma$  libres que la sujeten a la membrana, ya que la aportación de más subunidades  $G\alpha$  no supone una mejora en la potencia de los agonistas.

En conclusión, este estudio demuestra que las subunidades  $G\alpha$  miristoiladas pueden progresar desde el espacio periventricular al espesor del sistema nervioso donde por mecanismos selectivos penetran en las células neurales y logran integrarse funcionalmente con los receptores G enclavados en la membrana plasmática. La utilidad de este descubrimiento sirve para discriminar disfunciones causadas por alteraciones en la transducción, de aquellas debidas a perturbaciones a nivel del receptor de membrana. De esta forma se plantea la posibilidad de restaurar farmacológicamente la calidad de los efectos mediados por receptores G, cuando la transducción asociada sufre ciertas alteraciones

funcionales.

Sabemos de la eficacia de ciertos agonistas opioides en el tratamiento del dolor y de su limitación en la clínica por presentar tras administraciones repetidas fenómenos de tolerancia y dependencia. De hecho, una característica común a la familia de receptores G, particularmente destacable en el caso de los receptores opioides, es la rápida reducción de la señal en respuesta a una estimulación prolongada, de forma que la dosis de un compuesto capaz de producir inicialmente una elevada respuesta, se vuelve menos eficaz tras varias horas de tratamiento. Este proceso de desensibilización se ha caracterizado principalmente a nivel del receptor (su fosforilación mediante quinasas específicas y posterior unión de  $\beta$ -arrestinas). Sin embargo, en los últimos años son cada vez mas frecuentes los datos que indican que la pérdida de señalización de receptores G (en este caso particular los opioides) puede también producirse sin el concurso de fosforilación, internalización y reactivación. Por consiguiente, el receptor constituye la puerta de entrada de las señales de los agonistas, sin embargo, los mecanismos responsables de su pérdida de eficacia y del desarrollo de taquifilaxia o tolerancia pueden implicar también mecanismos postreceptor en el entorno de las proteínas G. Resultados obtenidos en el laboratorio han demostrado que la administración de subunidades alfa de las proteínas  $G_{i2}$  sirve para prevenir o revertir en su caso la aparición de taquifilaxia o tolerancia aguda opioide (Garzón y Sánchez-Blázquez, 2001).

Este estudio sugiere que durante el tiempo en que se produce la activación del receptor por un determinado ligando agonista, se produce una reducción progresiva de las proteínas G, o al menos de las subunidades  $G_{\alpha}$ , en su entorno

de forma que un receptor potencialmente activo no encuentra la forma de señalizar (receptor silente) y consecuentemente se produce la taquifilaxia / desensibilización. Un aporte de  $G\alpha$  exógenas logra la rápida reversión de este estado al unirse a los dímeros  $G\beta\gamma$  libres y reconstituir el heterotrímero funcional (receptor activo). Por el contrario, la tolerancia a largo plazo, que conlleva la fosforilación del receptor, no es sensible al aporte de  $G\alpha$  exógenas (receptor desacoplado) . Por tanto, la administración exógena de estas subunidades puede ser una valiosa herramienta a la hora de recuperar la funcionalidad de un sistema en situaciones de postdependencia.

Un **segundo aspecto** esencial en este trabajo ha sido abordar la caracterización de los mecanismos implicados en la internalización de las proteínas  $G\alpha$  y de los anticuerpos. Este estudio presentó una serie de dificultades iniciales, ya que los procedimientos habituales para solubilizar membranas cerebrales (detección por Western blotting) destruían la mayor parte de los complejos antígeno-anticuerpo formados *in vivo*, lo que hacía difícil seguir la progresión de las subunidades  $G\alpha$ -exógenas o de las IgGs en los compartimentos celulares. Afortunadamente, la aplicación de técnicas inmunohistoquímicas y autorradiográficas sobre cortes cerebrales de animales inyectados *in vivo* con anticuerpos frente a las proteínas G, permitieron detectar un marcaje específico en zonas periventriculares (Garzón y col., 1999).

Inicialmente se pensó que la organización tan específica del sistema transductor en los sinaptosomas podía ser la causa del acceso de las IgGs a sus antígenos. Coulter y col. (1992) mediante estudios de unión irreversible

(*Acrosslinking*) detectaron que las proteínas G interaccionan con las membranas biológicas nativas para formar multímeros. Además la existencia de péptidos insertados en la membrana celular capaces de regular directamente a las proteínas G era consistente con esta idea. Mousli y col. (1990) mostraron un modelo de activación de las proteínas G independiente de receptor en el cual ciertos péptidos interaccionan directamente con estas proteínas adoptando una conformación en la membrana plasmática que permitiría al péptido alcanzar el compartimento citosólico favoreciendo la interacción.

Estudios *in situ* nos mostraban una amplia distribución de las proteínas G endógenas (Worley y col; Asano y col., 1987) y de los correspondientes ARNm que las codifican (Largent y col., 1988) en el Sistema Nervioso. Sin embargo, las densidades se distribuyen de forma heterogénea en las diferentes regiones cerebrales. Existen una serie de estudios realizados por Asano y col., (1990), sobre la distribución regional de  $G\alpha_{i1}$ ,  $G\alpha_{i2}$  y  $G\alpha_o$  en el tejido nervioso de la rata. En el cerebro de rata, la  $G\alpha_{i1}$  es la que presenta al parecer una distribución más restringida, lo que unido al alto grado de conservación de su secuencia entre especies sugiere una gran especificidad en su función (Kim y col., 1988). Los estudios de distribución de  $G\alpha_o$  en rata muestran niveles significativos en corazón (Asano y col., 1988a; 1988b) y en cultivos celulares (Giershik y col., 1986b; Milligan y col., 1986) si bien se localiza principalmente en corteza cerebral, bulbo olfatorio, hipocampo, hipotálamo, tálamo, estriado y cerebelo (Asano y col., 1988, 1990; Ordford y col., 1991).

El factor decisivo para el desarrollo de nuestro trabajo, fue el empleo de anticuerpos previamente caracterizados en el laboratorio por su capacidad de

reconocer selectivamente a las distintas subunidades  $\alpha$  de las proteínas G (Sánchez-Blázquez y col., 1995; Garzón y col., 1997; Garzón y col., 1999). Posteriormente, y una vez comprobada su eficacia y selectividad para detectar *in vivo* a dichas subunidades, procedimos a marcarlos con una sonda fluorescente realizando un seguimiento en distintas zonas del Sistema Nervioso Central.

Los resultados de nuestros estudios de microscopia confocal, nos permitieron no solo localizar sino también cuantificar la intensidad del inmunomarcaje, que al mismo tiempo indicaba, un índice de unión de estos anticuerpos a sus correspondientes antígenos en zonas concretas del Sistema Nervioso Central de ratón. Por tanto, hemos confirmado que existe una internalización la cuál **depende de la presencia del antígeno**, ya que bien tratamientos con toxinas bacterianas que afectan la función de  $G\alpha_{i2}$ , o bien el bloqueo de la síntesis de dichas subunidades mediante el tratamiento crónico con ODNs específicos, impide la entrada de estos anticuerpos, no detectandose en ninguno de estos casos señal fluorescente

El minucioso análisis confocal llevado a cabo en este estudio, de las estructuras cerebrales comprendidas entre niveles 1-4 mm anterior y posterior al punto bregma, nos ha permitido establecer las zonas prioritarias en donde tiene lugar la unión específica del anticuerpo anti- $G\alpha_{i2}$  con la proteína endógena, correspondiendo fundamentalmente a la sustancia gris periacueductal, seguido de núcleo del rafe y estriado, sin embargo, los niveles de inmunomarcaje detectados en ratones control, no concuerda con la abundancia descrita para estos subtipos de proteínas G (Peraldi y col., 1989; Asano y col., 1990; Garzón y col., 1997).



En este sentido, hemos de mencionar, que los anticuerpos reconocen mejor a las  $G\alpha$  libres que a las que forman parte del trímero, de forma que el máximo nivel de detección correspondería al caso en que todas las subunidades  $G\alpha$  estuviesen disociadas (Garzón y col., 1997), explicándose así el aumento de inmunoseñal fluorescente correspondiente a la internalización de IgGs anti- $G\alpha_{i2}$  marcadas, en animales en los que las subunidades  $G\alpha$  habían sido activadas mediante el tratamiento con el agonista opiode morfina.

Al mismo tiempo, estos resultados junto con datos anteriores obtenidos por nuestro grupo sugerían la idea, de que las IgGs alcanzaban a las subunidades  $G\alpha$  en la membrana neuronal (Sánchez-Blázquez y col., 1992, 1993; Garzón y col., 1994). Por tanto los anticuerpos anti- $G\alpha$  interferirán no solo con las señales mediadas por receptores opioides, sino también con aquellas originadas en otros receptores celulares que regulan los mismos subtipos de estas proteínas G. Trabajos anteriores realizados en nuestro departamento, demuestran como tras la administración in vivo de anticuerpos específicos anti- $G\alpha_{i2}$ , se disminuyen los efectos de la clonidina y neurotensina, agonistas del receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico (Garzón y col., 1999).

Igualmente, en este trabajo hemos estudiado la distribución de fluorescencia acoplada a subunidades  $G\alpha_{i2}$  administradas *in vivo* en zonas discretas del Sistema Nervioso del ratón; estriado, corteza, hipocampo, diencéfalo, sustancia gris periacueductal, rafe, amígdala hipotálamo, tálamo son las estructuras fundamentalmente analizadas. En virtud de la correspondiente cuantificación de la información aportada por las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal,

podimos establecer la estrecha relación que se observa entre las zonas donde se identificó el marcaje correspondiente a las IgGs anti- $G\alpha_{i2}$  y a  $G\alpha_{i2}$ -exógenas; la internalización de ambas proteínas es detectada en los mismos niveles del Sistema Nervioso Central, coincidiendo especialmente en estructuras de alta implicación en la analgesia opioide, concretamente, a nivel de la sustancia gris periacueductal, a la que corresponden las imágenes mostradas en la figura 9 de este estudio.

A la vista de los resultados obtenidos, es importante destacar que la inmunoseñal correspondiente a las IgGs-marcadas, se distribuye uniformemente en el espesor del tejido hacia zonas internas, la bajada de señal observada tras el tratamiento con PTX, así como el aumento de fluorescencia provocado por la administración de morfina, indica que la internalización de IgGs anti- $G\alpha_{i2}$  es dependiente de la presencia de su antígeno endógeno  $G\alpha_{i2}$ , mientras que las subunidades  $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas administradas *in vivo*, marcan específicamente cuerpos celulares del Sistema Nervioso y su **entrada no** se ve afectada por los tratamientos con PTX o con agonistas como morfina los cuales si interfieren en la presencia /estado de su homólogo endógeno.

Técnicas de microscopia electrónica aportaron a este estudio nuevas evidencias neuroanatómicas de la internalización de estas proteínas  $G\alpha$ -exógenas administradas *in vivo*, revelando como células específicas localizadas en la pared del ventrículo cerebral eran capaces de internalizar mayoritariamente subunidades  $G\alpha_{i2}$  marcadas con oro coloidal de 6 nm, detectandose frecuentes agrupaciones de partículas de oro en la matriz citoplasmática de endimocitos ciliados, así como en zona perinuclear y núcleo de glía envolvente; se comprobó su presencia en

axones neurales, en la periferia de cuerpos celulares asociados con la membrana de diferentes procesos neurales, pudiendose así establecer, que estas subunidades  $G_{\alpha_{i2}}$ -exógenas progresaban principalmente hacia áreas sinápticas, lo cual indicaba su integración en neurotransmisión.

Para asegurarnos de que esta entrada era específica hicimos pruebas con un anticuerpo no relevante acoplado a oro coloidal y también con solo partículas de oro concentrado pudiendo comprobar como en ambos casos no tenía lugar internalización. En las fotografías de las situaciones control las partículas marcadas se observan en grandes cantidades fuera del tejido cerebral, adheridas a los cilios de las células epiteliales del epéndimo. No se sabe específicamente cuál es el lugar concreto de internalización, aunque parece que entran preferencialmente por unas células determinadas del epitelio. En algunas fotos podemos ver una entrada selectiva de los anticuerpos marcados en algunas de las células, e incluso la entrada parece ser específica por un punto determinado.

En la actualidad conocemos el proceso mediante el cual actúan los ODNs, como son captados por la célula mediante una pinocitosis (Stein y col., 1993), y una vez en el interior celular, como estos ODNs inducen sus efectos interfiriendo con la transcripción o desestabilizando el ARN mensajero bloqueando así la síntesis de la proteína a la que van dirigidos. Sin embargo, hasta este momento carecíamos de datos precisos sobre el mecanismo por el cual se producía la internalización de subunidades  $G_{\alpha}$ -miristoiladas administradas in vivo, o como los anticuerpos frente a las proteínas G interaccionan con las secuencias antigénicas en la membrana celular. Era por tanto relevante para nuestros estudios, indagar la existencia de un mecanismo fisiológico que pudiera estar implicado en la entrada

de estas proteínas, considerando que las IgGs no se mueven libremente a través de las membranas celulares y partiendo de dos hipótesis iniciales: que los anticuerpos reconocieran a su antígeno en la superficie de la membrana celular y lo bloqueasen, o que fueran capaces de ser captados de la misma manera que los ODNs.

Datos obtenidos por Stein (1993) y otros grupos recogen las interferencias mostradas en la entrada de albúmina, un marcador de pinocitosis, tras la administración de oligodeoxinucleótidos antisentido específicos e incluso mediante tratamientos con inhibidores como H7, staurosporina y DMSO (Yakubov y col., 1989; Stein y col., 1993; Beltinger y col., 1995).

Estas interferencias están relacionadas con la enzima PKC $\beta$ 1 (Stein y col., 1993) directamente implicada a su vez, en la internalización de subunidades G $\alpha$ i2-miristoiladas como se deduce tras el análisis de los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, en donde en los animales *Knock-down* de PKC $\beta$ 1 o tratados con H7, inhibidor específico de PKC, se ve reducida drásticamente la entrada de la proteína exógena, localizándose las partículas de oro ligadas a G $\alpha$ i2 en el exterior de la membrana plasmática, distribuídas a lo largo de los cilios no logrando alcanzar zonas más internas del tejido examinado, indicándose con ello, la selectividad de los mecanismos de entrada empleados por esta proteína.

Estos resultados nos permiten afirmar, que si bien los anticuerpos frente subunidades G alcanzan sus dianas específicas a través de un proceso sensible a PKC, es principalmente dependiente de la presencia del antígeno, el mecanismo

de entrada de subunidades G administradas in vivo se debe fundamentalmente a un proceso de pinocitosos dependiente de la integridad del enzima PKC $\beta$ 1.

Un **tercer aspecto** abordado en esta Memoria de Tesis fue caracterizar sobre cultivos celulares la internalización de las diferentes subunidades G $\alpha$ -exógenas de las proteínas G sensibles a PTX, analizando los posibles efectos en la señalización provocados por la administración de estas proteínas.

El cerebro, al igual que todas las estructuras nerviosas, está compuesto de dos elementos celulares básicos, las neuronas y las células gliales entre las que se encuentran los astrocitos, los cuales se encuentran expuestos a la acción de diversas sustancias que condicionan su desarrollo, funcionamiento y respuesta a la lesión del Sistema Nervioso; son a su vez fuente de sustancias, mediante las que se establecen relaciones tróficas con las neuronas. Durante el desarrollo o en condiciones de lesión o anómalas, pueden producir o incorporar factores tróficos, constituyendo así una fuente de estas sustancias que ayudaría al crecimiento y/o reparación de un sistema deficiente.

La idea de una unidad funcional dinámica neurona-glía ha sido formulada a partir de los años 80. Las células astrogliales o astrocitos están íntimamente asociadas a las neuronas; por tener una serie de propiedades se les confiere a estas células la capacidad de monitorizar (detectar, recibir e interpretar) continuamente la actividad de las neuronas: Funcionan como controladores del microambiente neuronal. Cualquier modificación de esta composición inicia una respuesta glial compensatoria, entre las que se incluyen **producir o incorporar factores neurotróficos que permitan la normalización y eviten la apoptosis neuronal**. Como estudios muy recientes implican a las proteínas G en patologías

de desordenes neurales (Nishino y col., 1993; Manji y col., 1995; Kelly y col., 1996; Li y col., 1996; Sim y col., 1996; DeFelipe y col., 1998; Avissar., 1999; Crouch 1990; 1999; 2000; Gershengorn y col., 2001), es especialmente relevante, por tanto, el aporte realizado por este estudio de investigación, al otorgar evidencias de la internalización tanto por neuronas como por células astrogiales, de subunidades  $G\alpha$ -exógenas de estas proteínas G.

Dado que no existen muchos datos bibliográficos al respecto, como punto de partida de este estudio pretendimos caracterizar la presencia de las diferentes subunidades  $G\alpha$  sensibles a PTX en células astrogiales del Sistema Nervioso Central de ratón. Mediante ensayos de inmunodetección con anticuerpos policlonales frente a las distintas  $G\alpha$ , pudimos observar bandas inmunorreactivas de 39 kDa, que corresponden al peso molecular descrito para la mayoría de estas proteínas.

La administración de anticuerpos generados frente a secuencias específicas de las subunidades  $G\alpha$  marcados con fluorescencia nos permitieron determinar como estas IgGs son capaces de incorporarse a las células in vivo y de unirse a sus dianas correspondientes, permitiendo establecer que  $G\alpha_{i2} > G\alpha_{i3} > G\alpha_o \sim G\alpha_{i1}$ , se distribuyen de forma homogénea en el citoplasma celular no registrándose su paso a través de la membrana nuclear. En este punto es importante mencionar que investigaciones recientes han descrito un mecanismo de activación de estas subunidades en respuesta a factores de crecimiento que lo relacionan con una posible capacidad mitogénica de las proteínas endógenas. Por ello queremos destacar que en estos estudios las IgGs eran administradas a células in vivo y en

condiciones basales. Los anticuerpos en estas condiciones se unen a las  $G\alpha$ -endógenas e impiden su activación y por tanto su traslocación al núcleo, no descartándose por tanto, que tras la activación de estas subunidades, estos anticuerpos se detecten en zonas nucleares.

De la misma forma que estos anticuerpos fueron capaces de llegar a sus respectivos antígenos, el análisis confocal correspondiente a las imágenes de la figura 22 de este estudio, muestra como subunidades  $G\alpha$  de proteínas G administradas en el medio de cultivo se internalizan uniformemente en el citoplasma tanto de neuronas como de astrocitos, pudiendo llegarse a establecer la incorporación tiempo-dependiente y prioritaria de  $G\alpha_{i2}$ .

La exploración de la internalización de estas proteínas en las distintas células del Sistema Nervioso Central, nos llevó a establecer una diferencia entre las poblaciones celulares estudiadas. En astrocitos pudimos detectar una inmediata y marcada concentración de  $G\alpha_{i2} > G\alpha_{i3}$  en zonas perinucleares y núcleo, observándose al mismo tiempo, procesos de mitosis celular en un alto porcentaje de la población, característicos de estas células al ser activadas por factores neurotróficos. La internalización de estas subunidades sobre neuronas se restringía al citoplasma celular sin detectarse su entrada en el núcleo. La retirada del aporte de estas proteínas para proceder al procesamiento habitual, implicaba un desprendimiento de las células de la matriz en la que se había efectuado el cultivo. Es decir, que las neuronas se hacían *dependientes* de la presencia de  $G\alpha_{i2}$  y solo podíamos procesar las muestras al añadir estas proteínas a los diferentes medios de lavado. Por tanto, la presencia de  $G\alpha_{i2}$  parece producir

cambios aún por determinar en los cultivos de neuronas que no parecen alterar el normal desarrollo.

Por otra parte, es importante señalar que, porcentajes de suero inferiores a los requeridos para el normal desarrollo celular, resultaron ser suficientes y particularmente fuertes inductores de la acumulación de G $\alpha$ i2-FLUOS en el núcleo en un gran porcentaje de células tras 16-20 horas de incubación. **Todos estos datos constituyen la primera evidencia de la mitogénica señal inducida directamente tras la internalización de subunidades G $\alpha$ i2-exógenas.**

En los últimos años han sido muy numerosos los trabajos que han sugerido que las proteínas G se agrupan en unas invaginaciones vesiculares de la membrana llamadas caveolas (Takashi y col., 1995; Parton, 1996). donde se produce una rápida transducción de señales celulares al permitirse un estrecho contacto entre todos los elementos necesarios para ella (Lisanti y col., 1994a, 1995a). Se estableció que las caveolas estaban presentes en la mayoría de células y eran especialmente abundantes en células endoteliales, fibroblastos, adipocitos y células del músculo liso (Parton, 1996) si bien en ese momento se consideraba que las células neurales carecían de estos compartimentos y que el ARNm de la caveolina, principal componente de la estructura de la caveola, no era detectable en el cerebro (Lisanti y col., 1994; Olive y col., 1995; Bouillot y col., 1996; Scherer y col., 1996).

Solo un año después se establecieron fuertes evidencias morfológicas de la existencia de caveolas en astrocitos (Cameron y col., 1997, Okamoto y col., 1998) demostrándose que las proteínas G endógenas sensibles a PTX se localizan en las



mismas y que la caveolina interacciona con  $G\alpha$  (Li y col., 1995, 1996), reconociendo específicamente solo a la conformación inactiva GDP de estas moléculas (Cameron y col., 1997, Okamoto y col., 1998)

Hoy en día, se sabe poco sobre la interacción entre las proteínas G y las caveolas *in vivo*, pero este podría ser un mecanismo por el cual estas proteínas se transportaran al interior celular. En los últimos años el grupo de Lisanti y Song han conseguido co-purificar caveolas junto con diferentes clases de moléculas señalizadoras que presentaban modificaciones lipídicas, palmitoilaciones y/o miristoilaciones, (Lisanti y col., 1994b; Schitzer y col., 1995; Smart y col., 1998b). Estudios más recientes sugieren, que la acilación de estas moléculas señalizadoras se requieren para la orientación en las caveolas (Chang y col., 1994; Lisanti y col., 1994b, 1998b).

En nuestro trabajo de investigación hemos detectado la presencia de caveolina en astrocitos mediante Western-blott® e inmunocitoquímica, verificando que el anticuerpo frente a caveolina es capaz de unirse a su diana específica tanto *in vivo* como *in vitro*, al detectarse mediante microscopía confocal, una fuerte señal punteada que se distribuye a lo largo de la membrana celular de forma organizada .

Al mismo tiempo, hemos demostrado la relevancia de estos compartimentos de transcitosis en la entrada de subunidades G-exógenas previamente marcadas, al detectar una considerable bajada de inmunoseñal fluorescente tras el tratamiento de las células con ODNs los cuales interfieren en la síntesis de caveolina. Como en todos nuestros estudios, la especificidad de la señal fue

demostrada al llevar en paralelo cultivos tratados previamente con ODN de secuencia aleatoria, el cual no interfiere en la síntesis de esta proteína. En estos grupos, las subunidades  $G\alpha$  administradas en el medio de cultivo, se integraron sin dificultad en citoplasma y núcleo de células astrogliales; al mismo tiempo, y gracias a técnicas de doble marcaje, pudimos comprobar como  $G\alpha_{i2}$ -Fluos, eran transportadas al interior celular por medio de las vesículas caveolares, ya que mediante técnicas confocales logramos conseguir imágenes de la colocación de ambos fluoróforos, si bien esta doble señalización desaparecía en cortes internos a nivel nuclear, en donde solo se captaba la señal correspondiente a la internalización de subunidades  $G\alpha$ .

Otra confirmación que refuerza la idea de la implicación de las caveolas en el transporte de subunidades  $G\alpha$  al interior celular, la aportan los resultados obtenidos con tratamientos que alteran el colesterol, componente lipídico fundamental de la membrana caveolar (Keller y col., 1998; Roy y col., 1999; Schlegel y col., 2000), como filipin III (Rothberg y col., 1990; Cazaubon y col., 1997; Texeira y col., 1999 ), el cual atenúa fuertemente la entrada de  $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas. Los pretratamientos bien con otro antibiótico como nystatina o con polimixina B, los cuales interaccionan con otros lípidos de membrana pero sin alterar el colesterol (Rothberg y col., 1990; Texeira y col., 1999), no afecta al patrón fluorescente correspondiente a la entrada de las  $G\alpha$ .

Otros tratamientos que dificultan la internalización de  $G\alpha_{i2}$ -exógenas son aquellos que actúan directamente sobre mecanismos concretos de endocitosis. Así, y corroborando los resultados obtenidos en los estudios estructurales, hemos

podido comprobar la implicación de la enzima PKC $\beta$ 1 en la entrada de estas subunidades G $\alpha$  administradas en el medio de cultivo. Los datos recogidos muestran como la entrada de G $\alpha$ -exógenas se ve drásticamente impedida tras la alteración de este enzima por tratamientos con inhibidores específicos como H7 (Parton y col., 1994; Wang y col., 1994; Tokuyama y col., 1995; Schmidt y col., 1998;), mientras que no la alteran otros compuestos (H8, H89...) que actúan sobre otras quinasas distintas. Consideramos que los resultados hasta ahora mencionados aportan evidencias que confirman nuestra hipótesis inicial de que subunidades G $\alpha$ -miristoiladas son capaces de llegar al interior de la membrana celular en virtud de un mecanismo de pinocitosis dependiente de la enzima PKC $\beta$ 1, siendo posteriormente transportadas hasta el citoplasma por vesículas de transcitosis altamente especializadas .

Podemos afirmar por tanto, que inhibidores de PKC $\beta$ 1, así como compuestos específicos que alteran el colesterol y por tanto la membrana caveolar, impiden la internalización de estas proteínas exógenas. Hemos de mencionar, que si bien las caveolas no están descritas en las neuronas, sí se han registrado otras proteínas con dominios semejantes a caveolina (*Caveolin-like proteins*) en complejos aislados de la corteza cerebral y del cerebelo (Cameron 1997). Una proteína que participa de rasgos comunes a caveolina es la proteína precursora amiloide (APP), una proteína transmembranal cuyos desórdenes estructurales están implicados en la patogénesis del Alzheimer. Caveolina y APP, miembros de una larga familia de genes (Panegyres y col., 1997; Parton., 1996), están presentes en los microdominios resistentes a detergentes no iónicos y se asemejan tanto en su composición como en sus propiedades (Bouillot y col., 1996;

Monier., 1995). Ambas, regulan a las subunidades  $\alpha$  de las proteínas G heterotriméricas en su forma inactiva unidas a GDP; la activación de  $G\alpha$  previene a su vez, la asociación de caveolina con APP (Li., 1995; Okamoto., 1995; Nishimoto., 1993) por lo que trabajos actuales consideran que esta proteína, pueda jugar un papel semejante a las caveolas en los procesos de señalización neural.

Otro aspecto importante investigado en este trabajo ha sido el abordar el estudio de otras funciones, hasta ahora desconocidas de las subunidades  $\alpha$  de las proteínas G. En las últimas décadas se consideraba que las proteínas G estaban implicadas únicamente en los procesos que se suceden tras la estimulación de un agonista por su receptor y la posterior generación de segundos mensajeros. Sin embargo, durante los últimos años diferentes grupos han demostrado que estas proteínas pueden ser reguladas simultánea o alternativamente por señales intracelulares (William y col., 2000; Crouch y col., 1999, 2000). La proteína  $G\alpha_o$  está presente en grandes cantidades en membranas procedentes de los conos de crecimiento, la GAP-43 (Murayama ., 1989). Así mismo, en la línea celular de neuroblastoma N1E-115 se han observado cambios en la expresión de la proteína  $G\alpha_o$  durante la diferenciación neuronal (Carter y Medzihradsky, 1993; Moises y col., 1994; Chan y col., 1995). Por otra parte, el tipo  $G\alpha_i$  participa en la estimulación de la división de fibroblastos de BALB/c3T3 inducida por factores de crecimiento (Sternweis y col., 1984; Neer y col., 1984; Goldsmith y col., 1988; Crouch y col., 1990).

Así tras la acción de factores neurotróficos, se observa una traslocación de  $G\alpha_i$  a zonas perinucleares y su unión a las bandas de cromatina del núcleo en

lugares específicos coincidiendo con la división celular (Crouch 1994, 1997 y 2000; Gudemann y col., 2000; Heuss y col., 2000). De esta forma las señales que inciden en el extremo del axón alcanzarían el núcleo donde actuarían como un mensajero, participando en el control del desarrollo neural en el embrión así como en el mantenimiento de la integridad en el adulto. Más concretamente, el subtipo  $G\alpha_{i2}$  interviene en el control del crecimiento y diferenciación de células F-9 (Crouch y col., 1989, 1990) y regula la diferenciación de células de teratocarcinoma a endodermo primitivo. Diversos autores mantienen por tanto, que las proteínas  $G\alpha_i$ -endógenas ligadas a GTPs son moléculas de regulación de crecimiento celular;  $G_i$  se transforma cuando es constitutivamente activa, y tales formas activas de  $G_i$  han podido ser actualmente detectadas en ciertos tipos de tumores (Crouch, M., 1999, 2000).

Los datos de microscopía confocal obtenidos sobre cultivos de astrocitos inicialmente sincronizados, mostraron que tras el tratamiento con proteínas  $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas, la estimulación de tan sólo un 0,1% de suero, induce la acumulación de dos poblaciones principales, unas en fase S y una población diploide completando la división (telofase o fase post-mitótica pre G1) con un alto contenido de  $G\alpha_{i2}$ -FLUOS en el núcleo. El porcentaje máximo de ambas poblaciones se obtuvo al suplementar el medio de cultivo hasta un 1% de suero, mientras que cantidades superiores no ofrecieron crecimientos proporcionales, interpretándose estos hechos como una saturación del sistema promovido por la alta actividad de  $G\alpha_{i2}$ -exógena.

Los análisis de incorporación de subunidades  $G\alpha_{i2}$  incubadas junto timidina

marcada, necesaria y específica para la replicación cromosómica y portadora del isótopo radiactivo tritio, permitió la medida del porcentaje de células que incorporaron esta base en la nueva síntesis de DNA, comprobando como en células mantenidas durante 24 horas en un mínimo porcentaje de suero imprescindible para el normal mantenimiento del cultivo, pero al mismo tiempo, insuficiente para promover síntesis de DNA en más de un 5% de la población, las subunidades  $G\alpha_{i2}$ -exógenas al ser incorporadas a las células e incubadas en las mismas condiciones, son capaces de migrar al núcleo después de completar la fase S y comenzar la mitosis en un porcentaje superior al 70% de la población.

La selectividad del proceso queda suficientemente demostrada, cuando tanto la administración de PTX como una única administración de anticuerpos específicos anti- $G\alpha_{i2}$ , bloquean la fase nuclear S y suprimen la progresión al ciclo celular promovida por estas proteínas en cultivos subconfluentes celulares e incubados de 1 a 4 días con los mismos porcentajes de suero. De la misma forma, tanto los tratamientos con agentes inhibidores de  $PKC\beta_1$ , como aquellos que actúan específicamente sobre el colesterol, modificando la membrana caveolar, bloquearon el efecto proliferativo promovido en astrocitos por la administración de la proteína  $G\alpha_{i2}$ -miristoilada.

Los ensayos de inmunocitoquímica con el marcador nuclear específico Ioduro de Propidio, confirmaron los datos hasta ahora obtenidos, al observar como un número definido de células plaqueadas en una matriz apropiada mostraba tan solo 2 horas después de ser incubadas con una única concentración de  $G\alpha_{i2}$ -miristoilada, más de un 60 por ciento de multiplicación de la población en

comparación con los cultivos controles llevados en paralelo y que no recibieron dicha proteína.

Así mismo pudimos detectar una bajada en los porcentajes correspondientes a población en división tras los tratamientos con PTX, anticuerpos específicos, o agentes que alteran los mecanismos de entrada de  $G\alpha_{i2}$ . Es importante mencionar, que la tinción se efectuó tras el periodo de incubación establecido con/sin el tratamiento sobre las células fijadas, correspondiéndose por tanto el número de núcleos teñidos con IP con la población total en ese momento.

Como último punto de este estudio proporcionamos los resultados obtenidos en este trabajo de la **incorporación productiva** tras su internalización, de subunidades G-exógenas a la **cascada de señalización**. La exploración confocal a distintos intervalos de tiempo del efecto provocado por el agonista opioide DPDPE en células que habían incorporado subunidades  $\alpha$ -exógenas marcadas con fluorescencia, aportó a nuestro estudio información altamente interesante ya que se pudo observar como periodos de tiempo inferiores a dos minutos bastaron para detectar una movilización de  $G\alpha$  desde el núcleo, en donde previamente esta proteína se había internalizado, hacia el citoplasma y de aquí hacia el medio externo, de tal forma que estas proteínas, tras responder ante el estímulo de agonistas, quedarían posiblemente susceptibles de ser captadas por otras células, completándose así el complejo entramado de reparación en sistemas deficientes.

Posteriormente establecimos como en sistemas  $G\alpha$ -deficientes, el agonista opioide DPDPE no recupera por sí solo la bajada de la actividad mitogénica basal

provocada por PTX o por IgGs procedentes del suero anti-G $\alpha_{i2}$ . La administración conjunta de este agonista con la proteína G $\alpha_{i2}$ -miristoilada, consigue una recuperación del 40% de síntesis de DNA, si bien en estas células en las que se había provocado un deterioro en la transducción, no se llegaron a alcanzar en ninguno de los casos los valores basales.

Nuestros últimos resultados recogidos en esta Memoria, muestran mediante técnicas inmunocitoquímicas convencionales, como anticuerpos específicos detectan selectivamente la internalización de la proteína G $\alpha_{i2}$ -endógena en el núcleo celular en respuesta al 1% de suero en el medio de cultivo, al mismo tiempo que el DPDPE induce una activación de la división celular inducida por estas proteínas endógenas. Creemos que nuestras investigaciones aportan datos relevantes que verifican y amplían de manera sustancial los trabajos anteriores limitados a efectos endógenos al poner de manifiesto que subunidades G $\alpha$ -exógenas son capaces de internalizarse, incorporarse a la cascada de señalización y como hacen las G $\alpha$  endógenas, provocar en células en cultivo procesos de síntesis de DNA y mitosis.

Como conjuntamente a la presencia de diferentes cambios que se observan en diferentes neuropatologías, en toda enfermedad neurodegenerativa existe un deterioro de la señalización en el que las proteínas G están implicadas, los resultados mostrados pueden permitir el desarrollo de nuevas estrategias para tratamiento de múltiples patologías a nivel de proteínas G (Gershengorn y Osman, 2001). Existe la posibilidad de que las subunidades  $\alpha$  de las proteínas G se comporten como segundos mensajeros de ciertos factores de crecimiento como,



por ejemplo, FGF el cual no se internaliza en las neuronas (Willard y col., 1998), posiblemente debido a su unión a la matriz extracelular. Estas moléculas podrían interaccionar con receptores en el terminal neuronal y generar segundos mensajeros estables que son los que experimentarían el transporte retrógrado por el axón hasta el soma para actuar incluso a nivel del núcleo (Hendry y Crouch, 1991).

En apoyo de esta hipótesis están los trabajos de Hendry y Crouch (1991, 1992) y de Crouch y col., (1994) en los que se observó que existía una acumulación de  $G\alpha_i$  y  $G\alpha_z$  en los lados proximal y distal de una ligadura realizada en el nervio ciático de ratón, demostrando que existe tanto transporte retrógrado como anterógrado de estas subunidades a lo largo del axón. Esta sería una forma de transmitir información no sólo desde el cuerpo celular hasta el axón, sino también desde el axón hasta el núcleo, actuando como un mensajero de las conexiones neurales de la periferia, y también llevando mensajes desde los órganos diana de esos factores de crecimiento hasta las neuronas.

Además, la subunidad  $\alpha$  de la proteína  $G_i$  parece tener un papel como mensajero en la inducción de la mitosis por esos factores de crecimiento que normalmente están asociados con receptores de tirosina kinasa. Estos hechos podrían explicar la presencia de anticuerpo anti- $G\alpha_i$  marcado con oro coloidal en el núcleo de alguna neurona que hemos observado en las preparaciones del microscopio electrónico. Considerando nuestras y otras observaciones de que las subunidades  $\alpha$  de las proteínas G se internalizan en la célula pasando de unas

células a otras, e incluso llegando al núcleo celular, podemos pensar que las proteínas G actuarían como mensajeros de algún factor de crecimiento viajando entre neuronas. Tendrían unas rutas de transporte establecidas y ejercerían así un papel importante en la comunicación celular, aparte del ya conocido hasta ahora como proteínas transductoras acopladas a receptor.

Existen bastantes evidencias de transporte retrógrado en vesículas recubiertas, sin embargo, no es así en el caso de proteínas aisladas. Debe de existir alguna modificación de estas proteínas, como la incorporación de algún lípido que les permita asociarse en vesículas recubiertas, o la sustitución de un grupo acilo por otro grupo que permita a la proteína abandonar la membrana plasmática, aunque estas modificaciones no están claras en este momento. En los terminales nerviosos ocurren muchas reacciones de acilación/deacilación que pueden generar proteínas modificadas y listas para el transporte retrógrado (Hendry, 1992). Por todo esto se puede pensar que las  $G\alpha_i$  pueden ser transportadas unidas a la membrana en vesículas recubiertas como ocurre en el transporte retrógrado de NGF (Schwab, 1977).

En trabajos del grupo de Rasenick (1996), se apunta la posibilidad de que la tubulina (proteína con actividad GTPasa) forme complejos con determinadas proteínas G y que esos complejos puedan proporcionar un lugar para la interacción de componentes del citoesqueleto y de la transducción de señales. En estos trabajos se observó el efecto inhibitorio de la tubulina sobre la AC. Los autores proponían que esto era debido a la transferencia de un análogo del GTP resistente

a la hidrólisis por parte de la tubulina a las subunidades  $\alpha_i$  de las proteínas G. Esto parece ser un mecanismo de regulación intracelular de la AC neuronal que podría participar en la modulación de la respuesta de los neurotransmisores.

Otro papel diferente del típico asignado a las proteínas G, es el mencionado por Moxham y col. (1993) que realizó experimentos con ratones transgénicos carentes de la subunidad  $\alpha_{i2}$  de las proteínas G. La pérdida de expresión de esta subunidad se relacionó con un aumento en los niveles basales de AMPc y con pérdida de la inhibición de la AC mediada por receptor. Además, demostraron que  $G\alpha_{i2}$  es necesaria en el desarrollo de la grasa y del hígado, puesto que la supresión de la proteína en estos tejidos, produjo una dramática reducción en el crecimiento neonatal. Esto sugiere que la reducción en la expresión de  $G\alpha_{i2}$  induce una alteración metabólica adversa afectando al crecimiento y no sólo a los órganos diana, sino también provocando efectos metabólicos pleiotrópicos.

Además de los efectos ya mencionados, las proteínas G son capaces de regular *in vivo* procesos como la regulación hormonal de lipólisis, glicogenólisis y gluconeogénesis (Chambers y col., 2000), además de estar implicadas en la oncogénesis y la diferenciación (Entschladen y Zanker., 2000; Avissar., 1999; Crouch y col., 1999, 2000). Por todo esto, podemos asumir que las proteínas G tienen un papel más amplio que el que se le asignaba hasta ahora.

De los resultados de nuestro trabajo se sugiere que las proteínas G en el SNC no estarían únicamente situadas en el interior de las células y asociadas a la

membrana plasmática de una manera estática, como se pensaba hasta ahora, sino que al menos sus subunidades  $\alpha$  serían móviles e incluso podrían salir al exterior celular para servir como **moléculas mensajeras capaces de traslocarse de célula a célula** en el SNC. Esta hipótesis en la que las subunidades  $\alpha$  se liberasen desde el terminal postsináptico al presináptico aportaría pruebas de funcionalidad sináptica, independientemente de que el neurotransmisor implicado sea inhibitorio o excitatorio, que es esencial en el desarrollo y mantenimiento de conexiones, la supervivencia celular y correcto funcionamiento de las neuronas. Finalmente, la observación de la captación de las subunidades  $G\alpha$  miristoiladas desde el espacio periventricular al espesor del sistema nervioso, y su incorporación a la cascada de señalización puede tener una enorme relevancia fisiológica ya que, la utilización de subunidades  $G\alpha$  exógenas podría llegar a consolidarse como una opción terapéutica alternativa o complementaria a las ya existentes en el tratamiento de determinados desordenes neurológicos en los que estén implicado un deterioro funcional de las proteínas G.

La exploración confocal a distintos intervalos de tiempo del efecto provocado por el agonista opioide DPDPE en células que habían incorporado subunidades  $\alpha$ -exógenas marcadas con fluorescencia, aportó a nuestro estudio información clave e inesperada, ya que periodos de tiempo inferiores a dos minutos bastaron para detectar una movilización de  $G\alpha$  desde el núcleo, en donde previamente esta proteína se había internalizado, hacia el citoplasma y de aquí hacia el medio externo, de tal forma que estas proteínas, tras responder ante el estímulo de agonistas, quedarían posiblemente susceptibles de ser captadas por otras células, completandose así el complejo entramado de reparación en sistemas deficientes

## Conclusiones

---

- 1.- La microinyección en el ventrículo cerebral del ratón de subunidades  $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas recombinantes acopladas a marcadores fluorescentes, conduce a su captación/internalización por las células neurales localizándose fundamentalmente en zonas periventriculares, estriado, núcleo del rafe y sustancia gris periacueductal.
- 2.- Las imágenes inmunofluorescentes obtenidas tras la administración de las proteínas recombinantes  $G\alpha_{i2}$ , son cualitativamente idénticas a las observadas al inyectar *in vivo* anticuerpos específicos anti- $G\alpha_{i2}$  acoplados al mismo marcador fluorescente, lo que sugiere que ambas proteínas emplean la misma ruta de entrada.
- 3.- El análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica, confirma la internalización de subunidades  $G\alpha_{i2}$ , las cuales son transportadas a través de las membranas celulares por un mecanismo altamente selectivo semejante a procesos pinocitóticos de fase fluída. Estas proteínas exógenas acopladas a oro coloidal, fueron localizadas en citoplasma y membrana plasmática de diferentes procesos neurales, así como en dendritas y formando parte de sinapsis.
- 4.- Nuestros datos demuestran, al mismo tiempo, la incorporación de estas subunidades a la cascada de señalización iniciada por el receptor, ya que la administración de  $G\alpha$ -exógenas, restaura la actividad de agonistas en sistemas de señalización que se han hecho experimentalmente deficientes en estas proteínas mediante la administración de ODNs para disminuir su expresión selectiva.
- 5.- Por el contrario, la administración de  $G\alpha_{i2}$ , ejercen un mínimo efecto sobre la potencia de agonistas en células/animales control. Esta observación sugiere que en situaciones de normalidad, la relación Receptor/Proteína G en los microdominios de la membrana es óptima, y no mejora por el aporte de  $G\alpha$  exógenas.
- 6.- El mecanismo de entrada de  $G\alpha$ -miristoilada semeja los procesos de

## **Conclusiones**

---

pinocitosis ya que es dependiente de la integridad de la enzima PKC $\beta$ 1, de tal forma que alteraciones provocadas por tratamientos con inhibidores específicos de este enzima u ODNs para disminuir la expresión, bloquean la entrada de las proteínas exógenas

**7.-** El análisis realizado mediante microscopía confocal muestra que tras su internalización subunidades G $\alpha$ -exógenas de las proteínas G conjugadas a fluorescencia, alcanzan de forma dosis-dependiente citosol y núcleo de las células astrogiales e inducen la división de estas células.

**8.-** La capacidad de incorporar timidina marcada con tritio al administrar G $\alpha$ i/o, estableció la relevancia de G $\alpha$ <sub>i2</sub> en el ciclo celular. Los resultados de este trabajo de investigación son la primera evidencia de la señal mitogénica inducida directamente tras la internalización de subunidades G $\alpha$ -exógenas al provocar procesos de síntesis de DNA y mitosis superiores a los inducidos por altos porcentajes de factores neurotróficos.

**9.-** Tratamientos con filipin III, antibiótico capaz de alterar la membrana caveolar o de ODNs selectivos frente a caveolina, muestran la implicación de estas vesículas de transcitosis altamente especializadas, en el transporte hacia el interior celular de proteínas G $\alpha$ -miristoiladas.

**10.-** La integración funcional de las subunidades G $\alpha$ -miristoiladas, indica la posibilidad de restaurar farmacológicamente la calidad de los efectos mediados por receptores G cuando la transducción asociada sufre ciertas alteraciones funcionales. Este hallazgo posibilita su uso terapéutico en circunstancias en que se produce deterioro bien en número y/o funciones de las correspondientes proteínas G endógenas.

1. Aridor M, Rajmlevich G, Beaven MA, Sagi-Eisenberg R. Activation of exocytosis by the heterotrimeric G protein Gi3. *Science*. 1993 Dec 3;262(5139):1569-72.
2. Asano T, Kamiya N, Morishita R, Kato K. Immunoassay for the beta gamma subunits of GTP-binding proteins and their regional distribution in bovine brain. *J Biochem (Tokyo)*. 1988 Jun;103(6):950-3.
3. Asano T, Kamiya N, Semba R, Kato K. Ontogeny of the GTP-binding protein Go in rat brain and heart. *J Neurochem*. 1988 Dec;51(6):1711-6.
4. Asano T, Morishita R, Kato K. Identification of a guanine nucleotide-binding protein G(o) in human neuroblastoma. *Cancer Res*. 1988 May 15;48(10):2756-9.
5. Asano T, Morishita R, Kato K. Immuno-affinity purification and characterization of the alpha subunits of G0 type G proteins from various bovine tissues. *J Biochem (Tokyo)*. 1991 Oct;110(4):571-4.
6. Asano T, Nagahama M, Kato K. Subcellular distribution of GTP-binding proteins, Go and Gi2, in rat cerebral cortex. *J Biochem (Tokyo)*. 1990 May;107(5):694-8.
7. Asano T, Shinohara H, Morishita R, Kato K. Immunochemical and immunohistochemical localization of the G protein Gi1 in rat central nervous. *J Biochem (Tokyo)*. 1990 Dec;108(6):988-94.
8. Avidor-Reiss T, Nevo I, Saya D, Bayewitch M, Vogel Z. Opiate-induced adenylyl cyclase superactivation is isozyme-specific. *J Biol Chem*. 1997 Feb 21;272(8):5040-7.
9. Avissar S. The Role of G Proteins in the Psychobiology and Treatment of Affective Disorders and Their Integration with the Neurotransmitter Hypothesis. *Curr Psychiatry Rep*. 1999 Dec;1(2):148-153.
10. Bauer PH, Muller S, Puzicha M, Pippig S, Obermaier B, Helmreich EJ, Lohse MJ. Phosducin is a protein kinase A-regulated G-protein regulator. *Nature*. 1992 Jul 2;358(6381):73-6.
11. Beals CR, Wilson CB, Perlmutter RM. A small multigene family encodes Gi signal-transduction proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Nov;84(22):7886-90.
12. Beltinger C, Saragovi HU, Smith RM, LeSauter L, Shah N, DeDionisio L, Christensen L, Raible A, Jarett L, Gewirtz AM. Binding, uptake, and intracellular trafficking of phosphorothioate-modified oligodeoxynucleotides. *J Clin Invest*. 1995 Apr;95(4):1814-23.
13. Berlot CH, Bourne HR. Identification of effector-activating residues of Gs alpha. *Cell*. 1992 Mar 6;68(5):911-22.



14. Berman DM, Gilman AG. Mammalian RGS proteins: barbarians at the gate. *J Biol Chem.* 1998 Jan 16;273(3):1269-72.
15. Berti-Mattera LN, Douglas JG, Mattera R, Goraya TY. Identification of G protein subtypes in peripheral nerve and cultured Schwann cells. *J Neurochem.* 1992 Nov;59(5):1729-35.
16. Bigay J, Faurobert E, Franco M, Chabre M. Roles of lipid modifications of transducin subunits in their GDP-dependent association and membrane binding. *Biochemistry.* 1994 Nov 29;33(47):14081-90.
17. Birnbaumer L, Codina J, Mattera R, Yatani A, Graf R, Olate J, Sanford J, Brown AM. Receptor-effector coupling by G proteins: purification of human erythrocyte Gi-2 and Gi-3 and analysis of effector regulation using recombinant alpha subunits synthesized in *Escherichia coli*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1988;53 Pt 1:229-39.
18. Birnbaumer L, Codina J, Mattera R, Yatani A, Scherer N, Toro MJ, Brown. Signal transduction by G proteins. *Kidney Int Suppl.* 1987 Dec;23:S14-42
19. Bitensky MW, Rasenick MM, Stein PJ. The regulatory subunit of adenylate cyclase interacts with cytoskeletal components. *Nature.* 1981 Dec 10;294(5841):560-2.
20. Bouilliot C, Prochiantz A, Rougon G, Allinquant B. Axonal amyloid precursor protein expressed by neurons in vitro is present in a membrane fraction with caveolae-like properties. *J Biol Chem.* 1996 Mar 29;271(13):7640-4.
21. Boyer JL, Graber SG, Waldo GL, Harden TK, Garrison JC. Selective activation of phospholipase C by recombinant G-protein alpha- and beta gamma-subunits. *J Biol Chem.* 1994 Jan 28;269(4):2814-9.
22. Cali JJ, Parekh RS, Krupinski J. Splice variants of type VIII adenylyl cyclase. Differences in glycosylation and regulation by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin. *J Biol Chem.* 1996 Jan 12;271(2):1089-95.
23. Cameron PL, Ruffin JW, Bollag R, Rasmussen H, Cameron RS. Identification of caveolin and caveolin-related proteins in the brain. *J Neurosci.* 1997 Dec 15;17(24):9520-35.
24. Camps M, Carozzi A, Schnabel P, Scheer A, Parker PJ, Gierschik P. Isozyme-selective stimulation of phospholipase C-beta 2 by G protein beta gamma-subunits. *Nature.* 1992 Dec 17;360(6405):68

25. Carter BD, Medzihradsky F. Go mediates the coupling of the mu opioid receptor to adenylyl cyclase in cloned neural cells and brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 May 1;90(9):4062-65
26. Casey PJ. Lipid modifications of G proteins. *Curr Opin Cell Biol*. 1994 Apr;6(2):219-25. Review
27. Cazaubon S, Chaverot N, Romero IA, Girault JA, Adamson P, Strosberg AD, Couraud PO. Growth factor activity of endothelin-1 in primary astrocytes mediated by adhesion-dependent and -independent pathways. *J Neurosci*. 1997 Aug 15;17(16):6203-12.
28. Chabre O, Conklin BR, Brandon S, Bourne HR, Limbird LE. Coupling of the alpha 2A-adrenergic receptor to multiple G-proteins. A simple approach for estimating receptor-G-protein coupling efficiency in a transient expression system. *J Biol Chem*. 1994 Feb 25;269(8):5730-4.
29. Chambers JK, Macdonald LE, Sarau HM, Ames RS, Freeman K, Foley JJ, Zhu Y, McLaughlin MM, Murdock P, McMillan L, Trill J, Swift A, Aiyar N, Taylor P, Vawter L, Naheed S, Szekeres P, Hervieu G, Scott C, Watson JM, Murphy AJ, Duzic E, Klein C, Bergsma DJ, Wilson S, Livi GP. A G protein-coupled receptor for UDP-glucose. *J Biol Chem*. 2000 Apr 14;275(15):10767-71.
30. Chan JS, Chiu TT, Wong YH. Activation of type II adenylyl cyclase by the cloned mu-opioid receptor: coupling to multiple G proteins. *J Neurochem*. 1995 Dec;65(6):2682-9.
31. Chang AM, Baranger HU, Pfeiffer LN, West KW. Weak localization in chaotic versus nonchaotic cavities: A striking difference in the line shape. *Phys Rev Lett*. 1994 Oct 10;73(15):2111-2114.
32. Chun JS, Ha MJ, Jacobson BS. Differential translocation of protein kinase C epsilon during HeLa cell adhesion to a gelatin substratum. *J Biol Chem*. 1996 May 31;271(22):13008-12
33. Chun M, Liyanage UK, Lisanti MP, Lodish HF. Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Nov 22;91(24):11728-32.
34. Clapham DE, Neer EJ. New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling. *Nature*. 1993 Sep 30;365(6445):403-6.
35. Clapham DE. Intracellular signalling: more jobs for G beta gamma. *Curr Biol*. 1996 Jul 1;6(7):814-6.
36. Clapham DE. The G-protein nanomachine. *Nature*. 1996 Jan 25;379(6563):297-9.

37. Codina J, Olate J, Abramowitz J, Mattera R, Cook RG, Birnbaumer L. Alpha i-3 cDNA encodes the alpha subunit of G<sub>k</sub>, the stimulatory G protein of receptor-regulated K<sup>+</sup> channels. *J Biol Chem*. 1988 May 15;263(14):6746-50.
38. Coleman DE, Berghuis AM, Lee E, Linder ME, Gilman AG, Sprang SR. Structures of active conformations of Gi alpha 1 and the mechanism of GTP hydrolysis. *Science*. 1994 Sep 2;265(5177):1405-12.
39. Coleman DE, Lee E, Mixon MB, Linder ME, Berghuis AM, Gilman AG, Sprang SR. Crystallization and preliminary crystallographic studies of Gi alpha 1 and mutants of Gi alpha 1 in the GTP and GDP-bound states. *J Mol Biol*. 1994 May 13;238(4):630-4.
40. Coleman DE, Sprang SR. How G proteins work: a continuing story. *Trends Biochem Sci*. 1996 Feb;21(2):41-4.
41. Cooper JR. Including narcotic addiction treatment in an office-based practice. *JAMA*. 1995 May 24-31;273(20):1619-20.
42. Couet J, Li S, Okamoto T, Ikezu T, Lisanti MP. Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J Biol Chem*. 1997 Mar 7;272(10):6525-33.
43. Couet J, Sargiacomo M, Lisanti MP. Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities. *Biol Chem*. 1997 Nov 28;272(48):30429-3
44. Coulter S, Rodbell M. Heterotrimeric G proteins in synaptoneurosome membranes are crosslinked by p-phenylenedimaleimide, yielding structures comparable in size to crosslinked tubulin and F-actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Jul 1;89(13):5842-6.
45. Crouch MF, Belford DA, Milburn PJ, Hendry IA. Pertussis toxin inhibits EGF-, phorbol ester- and insulin-stimulated DNA synthesis in BALB/c3T3 cells: evidence for post-receptor activation of Gi alpha. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990 Mar 30;167(3):1369-76.
46. Crouch MF, Osborne GW, Willard FS. The GTP-binding protein G(ialpha) translocates to kinetochores and regulates the M-G(1) cell cycle transition of Swiss 3T3 cells. *Cell Signal*. 2000 Mar;12(3):153-63.
47. Crouch MF, Simson L. The G-protein G(i) regulates mitosis but not DNA synthesis in growth factor-activated fibroblasts: a role for the nuclear translocation of G(i). *FASEB J*. 1997 Feb;11(2):189-98.

48. Crouch MF, Simson L. The GTP-binding protein Gi alpha 2 is directly linked to and substrate of a serine kinase in Balb/c3T3 cells. *Cell Signal*. 1994 Aug;6(6):695-706.
49. Danner S, Lohse MJ. Phosducin is a ubiquitous G-protein regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Sep 17;93(19):10145-50.
50. De Vries L, Elenko E, McCaffery JM, Fischer T, Hubler L, McQuistan T, Watson N, Farquhar MG. RGS-GAIP, a GTPase-activating protein for G $\alpha$  heterotrimeric G proteins, is located on clathrin-coated vesicles. *Mol Biol Cell*. 1998 May;9(5):1123-34.
51. DeFelipe J, Marco P, Sola RG, Sánchez-Blázquez P, Garzon J. Local changes in GTP-binding protein immunoreactivities in human epileptogenic neocortex. *Exp Brain Res*. 1998 Mar;119(2):153-8.
52. Degtyarev MY, Spiegel AM, Jones TL. Increased palmitoylation of the Gs protein alpha subunit after activation by the beta-adrenergic receptor or cholera toxin. *J Biol Chem*. 1993 Nov 15;268(32):23769-72.
53. Degtyarev MY, Spiegel AM, Jones TL. The G protein alpha s subunit incorporates [3H]palmitic acid and mutation of cysteine-3 prevents this modification. *Biochemistry*. 1993 Aug 17;32(32):8057-61.
54. Deschenes RJ, Resh MD, Broach JR. Acylation and prenylation of proteins. *Curr Opin Cell Biol*. 1990 Dec;2(6):1108-13.
55. DeVivo M, Iyengar R. G protein pathways: signal processing by effectors. *Mol Cell Endocrinol*. 1994 Apr;100(1-2):65-70.
56. DeVries L, Fischer T, Elenko E, McCaffery JM, Farquhar MG. Clathrin-coated vesicles bearing GAIP possess GTPase-activating protein activity in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jun 8;96(12):6722-.
57. DiBello PR, Garrison TR, Apanovitch DM, Hoffman G, Shuey DJ, Mason K, Cockett MI, Dohlman HG. Selective uncoupling of RGS action by a single point mutation in the G protein alpha-subunit. *J Biol Chem*. 1998 Mar 6;273(10):5780-4.
58. Dohlman HG, Song J, Apanovitch DM, DiBello PR, Gillen KM. Regulation of G protein signalling in yeast. *Semin Cell Dev Biol*. 1998 Apr;9(2):135-41.
59. Dohlman HG, Song J, Ma D, Courchesne WE, Thorner J. Sst2, a negative regulator of pheromone signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: expression, localization, and genetic interaction and physical association with Gpa1 (the G-protein alpha subunit). *Mol Cell Biol*. 1996 Sep;16(9):5194-209.

60. Dohlman HG, Thorner J. RGS proteins and signaling by heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem.* 1997 Feb 14;272(7):3871-4.
61. Dowd T, Barac-Nieto M, Gupta RK, Spitzer A. <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance and saturation transfer studies of the isolated perfused rat kidney. *Ren Physiol Biochem.* 1989 May-Jun;12(3):161-70.
62. Eckhardt B, Fishman S, Varga I. Semiclassical cross section correlations *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics.* 2000 Dec;62(6 Pt A):7867-71.
63. Engelman JA, Wykoff CC, Yasuhara S, Song KS, Okamoto T, Lisanti MP. Recombinant expression of caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent growth. *J Biol Chem.* 1997 Jun 27;272(26):16374-81.
64. Engelman JA, Zhang XL, Lisanti MP. Genes encoding human caveolin-1 and -2 are co-localized to the D7S522 locus (7q31.1), a known fragile site (FRA7G) that is frequently deleted in human cancers. *FEBS Lett.* 1998 Oct 9;436(3):40
65. Entschladen F, Gunzer M, Scheuffele CM, Niggemann B, Zanker KS. T lymphocytes and neutrophil granulocytes differ in regulatory signaling and migratory dynamics with regard to spontaneous locomotion and chemotaxis. *Cell Immunol.* 2000 Feb 1;199(2):104-
66. Evanko DS, Thiyagarajan MM, Wedegaertner PB. Interaction with Gbetagamma is required for membrane targeting and palmitoylation of Galpha(s) and Galpha(q). *J Biol Chem.* 2000 Jan 14;275(2):1327-36.
67. Fields TA, Casey PJ. Phosphorylation of Gz alpha by protein kinase C blocks interaction with the beta gamma complex. *J Biol Chem.* 1995 Sep 29;270(39):23119-25.
68. Frangioni JV, Oda A, Smith M, Salzman EW, Neel BG. Calpain-catalyzed cleavage and subcellular relocation of protein phosphotyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) in human platelets. *EMBO J.* 1993 Dec;12(12):4843-56.
69. Gallego C, Gupta SK, Winitz S, Eisfelder BJ, Johnson GL. Myristoylation of the G alpha i2 polypeptide, a G protein alpha subunit, is required for its signaling and transformation functions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Oct 15;89(20):9695-9.
70. Garcia-Cardena G, Martasek P, Masters BS, Skidd PM, Couet J, Li S, Lisanti MP, Sessa WC. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem.* 1997 Oct 10;272(41):25437-40.

71. Garzón J, Castro M, Sánchez-Blázquez P. Influence of G<sub>z</sub> and G<sub>i2</sub> transducer proteins in the affinity of opioid agonists to micro receptors. *Eur J Neurosci.* 1998 Aug;10(8):2557-64.
72. Garzón J, Castro MA, Juarros JL, Sánchez-Blázquez P. Antibodies raised against the N-terminal sequence of delta opioid receptors blocked delta-mediated supraspinal antinociception in mice. *Life Sci.* 1994;54(11):PL191-6.
73. Garzón J, de Antonio I, Sánchez-Blázquez P. In vivo modulation of G proteins and opioid receptor function by antisense oligodeoxynucleotides. *Methods Enzymol.* 2000;314:3-20.
74. Garzón J, DeFelipe J, Rodríguez JR, DeAntonio I, Garcia-Espana A, Sánchez-Blázquez P. Transport of CSF antibodies to Galpha subunits across neural membranes requires binding to the target protein and protein kinase C activity. *Brain Res Mol Brain Res.* 1999 Mar 5;65(2):151-66.
75. Garzón J, DeFelipe J, Rodríguez JR, DeAntonio I, Garcia-Espana A, Sánchez-Blázquez P. Transport of CSF antibodies to Galpha subunits across neural membranes requires binding to the target protein and protein kinase C activity. *Brain Res Mol Brain Res.* 1999 Mar 5;65(2):151-66.
76. Garzón J, Garcia-Espana A, Sánchez-Blázquez P. Opioids binding mu and delta receptors exhibit diverse efficacy in the activation of G<sub>i2</sub> and G<sub>(x/z)</sub> transducer proteins in mouse periaqueductal gray matter. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997 Apr;281(1):549-57
77. Garzón J, Martinez-Pena Y, Sánchez-Blázquez P. G<sub>x/z</sub> is regulated by mu but not delta opioid receptors in the stimulation of the low K<sub>m</sub> GTPase activity in mouse periaqueductal grey matter. *Eur J Neurosci.* 1997 Jun;9(6):1194-200.
78. Garzón J, Martinez-Peña Y, Sánchez-Blázquez P. Dissimilar efficacy of opioids to produce mu-mediated analgesia: role of G<sub>x/z</sub> and G<sub>i2</sub> transducer proteins. *Life Sci.* 1994;55(11):PL205-12.
79. Garzón J, Rodríguez-Díaz M, DeAntonio I, DeFelipe J, Rodríguez JR, Sánchez-Blázquez P. Myr<sup>+</sup>-G<sub>i2</sub> alpha and G<sub>o</sub> alpha subunits restore the efficacy of opioids, clonidine and neurotensin giving rise to antinociception in G-protein knock-down mice. *Neuropharmacology.* 1999 Dec;38(12):1861-73.
80. Gaudet R, Bohm A, Sigler PB. Crystal structure at 2.4 angstroms resolution of the complex of transducin betagamma and its regulator, phosducin. *Cell.* 1996 Nov 1;87(3):577-88.

81. Gerhardt MA, Neubig RR. Multiple Gi protein subtypes regulate a single effector mechanism. *Mol Pharmacol*. 1991 Nov;40(5):707-11.
82. Gershengorn MC, Osman R. Minireview: Insights into G Protein-Coupled Receptor Function Using Molecular Models. *Endocrinology*. 2001 Jan 1;142(1):2-10.
83. Gierschik P, Milligan G, Pines M, Goldsmith P, Codina J, Klee W, Spiegel A. Use of specific antibodies to quantitate the guanine nucleotide-binding protein Go brain *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Apr;83(7):2258-62.
84. Gierschik P, Morrow B, Milligan G, Rubin C, Spiegel A. Changes in the guanine nucleotide-binding proteins, Gi and Go, during differentiation of 3T3-L1 cells. *FEBS Lett*. 1986 Apr 7;199(1):103-6.
85. Gilman AG. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem*. 1987;56:615-49.
86. Glenney JR. The sequence of human caveolin reveals identity with VIP21, a component of transport vesicles. *FEBS Lett*. 1992 Dec 7;314(1):45-8.
87. Glenney JR. Tyrosine phosphorylation of a 22-kDa protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virus. *J Biol Chem*. 1989 Dec 5;264(34):20163-65
88. Glenney JR. Tyrosine-phosphorylated proteins: mediators of signal transduction from the tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta*. 1992 Mar 16;1134(2):113-27.
89. Glick JL, Meigs TE, Miron A, Casey PJ. RGSZ1, a Gz-selective regulator of G protein signaling whose action is sensitive to the phosphorylation state of G $\alpha$ . *J Biol Chem*. 1998 Oct 2;273(40):26008-13.
90. Goldsmith P, Backlund PS, Rossiter K, Carter A, Milligan G, Unson CG, Spiegel A. Purification of heterotrimeric GTP-binding proteins from brain: identification of a novel form of Go. *Biochemistry*. 1988 Sep 6;27(18):7085-90.
91. Graziano MP, Freissmuth M, Gilman AG. Expression of Gs  $\alpha$  in *Escherichia coli*. Purification and properties of two forms of the protein. *J Biol Chem*. 1989 Jan 5;264(1):409-18
92. Grishin AV, Weiner JL, Blumer KJ. Biochemical and genetic analysis of dominant-negative mutations affecting a yeast G-protein gamma subunit. *Mol Cell Biol*. 1994 Jul;14(7):4571-8.
93. Gudemann CJ, Weitz J, Kienle P, Lacroix J, Wiesel MJ, Soder M, Benner A, Staehler G, Doeberitz MV. Detection of hematogenous micrometastasis in patients with transitional cell carcinoma.

94. Guzzi F, Celano E, Levi G, Parenti M. Interaction between HIV-1 NEF and G(o) proteins in transfected COS-7 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Apr 13;270(2):570-5.
95. Haga T, Haga K, Kameyama K, Nakata H. [Regulation of G protein-coupled receptor kinase activity]. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 1994 Sep;104(3):207-16.
96. Hamm HE, Gilchrist A. Heterotrimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol*. 1996 Apr;8(2):189-96.
97. Hamm HE, Gilchrist A. Heterotrimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol*. 1996 Apr;8(2):189-96.
98. Hekman M, Bauer PH, Sohlemann P, Lohse MJ. Phosducin inhibits receptor phosphorylation by the beta-adrenergic receptor kinase in a PKA-regulated manner. *FEBS Lett*. 1994 Apr 25;343(2):120-4.
99. Hellevuo K, Hoffman PL, Tabakoff B. Adenylyl cyclases: mRNA and characteristics of enzyme activity in three areas of brain. *J Neurochem*. 1996 Jul;67(1):177-85.
100. Hellevuo K, Yoshimura M, Mons N, Hoffman PL, Cooper DM, Tabakoff B. The characterization of a novel human adenylyl cyclase which is present in brain and other tissues. *J Biol Chem*. 1995 May 12;270(19):11581-9.
101. Hendry IA, Crouch MF. Retrograde axonal transport of the GTP-binding protein Gi alpha: a potential neurotrophic intra-axonal messenger. *Neurosci Lett*. 1991 Nov 25;133(1):29-32.
102. Hendry LB, Muldoon TG, Mahesh VB. The metabolic pathways for hormonal steroids appear to be reflected in the stereochemistry of DNA. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1992 Aug;42(7):659-70.
103. Hepler JR, Berman DM, Gilman AG, Kozasa T. RGS4 and GAIP are GTPase-activating proteins for Gq alpha and block activation of phospholipase C beta by gamma-thio-GTP-Gq alpha.
104. Hepler JR, Gilman AG. G proteins. *Trends Biochem Sci*. 1992 Oct;17(10):383-7.
105. Hepler JR. Emerging roles for RGS proteins in cell signalling. *Trends Pharmacol Sci*. 1999 Sep;20(9):376-82.
106. Hepler JR. Emerging roles for RGS proteins in cell signalling. *Trends Pharmacol Sci*. 1999 Sep;20(9):376-82



107. Herlitze S, Villarroel A, Witzemann V, Koenen M, Sakmann B. Structural determinants of channel conductance in fetal and adult rat muscle acetylcholine receptors. *J Physiol.* 1996 May 1;492 ( Pt 3):775-87
108. Hescheler J, Rosenthal W, Trautwein W, Schultz G. The GTP-binding protein, Go, regulates neuronal calcium channels. *Nature.* 1987 Jan 29-Feb 4;325(6103):445-7.
109. Heuss C, Gerber U. G-protein-independent signaling by G-protein-coupled receptors *Trends Neurosci.* 2000 Oct;23(10):469-75.
110. Heximer SP, Watson N, Linder ME, Blumer KJ, Hepler JR. RGS2/G0S8 is a selective inhibitor of Gqalpha function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Dec 23;94(26):14389-93.
111. Higgins JB, Casey PJ. In vitro processing of recombinant G protein gamma subunits. Requirements for assembly of an active beta gamma complex. *J Biol Chem.* 1994 Mar 25;269(12):9067-73.
112. Ho BY, Uezono Y, Takada S, Takase I, Izumi F. Coupling of the expressed cannabinoid CB1 and CB2 receptors to phospholipase C and G protein-coupled inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels. *Receptors Channels.* 1999;6(5):363-74.
113. Ho IH, Murrell-Lagnado RD. Molecular mechanism for sodium-dependent activation of G protein-gated K<sup>+</sup> channels. *J Physiol.* 1999 Nov 1;520 Pt 3:645-51.
114. Ho MK, Yung LY, Wong YH. Disruption of receptor-mediated activation of G protein by mutating a conserved arginine residue in the switch II region of the alpha subunit. *J Neurochem.* 1999 Nov;73(5):2101-9.
115. Horstman DA, Brandon S, Wilson AL, Guyer CA, Cragoe EJ, Limbird LE. An aspartate conserved among G-protein receptors confers allosteric regulation of alpha 2-adrenergic receptors by sodium. *J Biol Chem.* 1990 Dec 15;265(35):21590-5.
116. Huang C, Hepler JR, Chen LT, Gilman AG, Anderson RG, Mumby SM. Organization of G proteins and adenylyl cyclase at the plasma membrane. *Mol Biol Cell.* 1997 Dec;8(12):2365-78.
117. Huang Z, Chen Y, Nissenson RA. The cytoplasmic tail of the G-protein-coupled receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein contains positive and negative signals for endocytosis. *J Biol Chem.* 1995 Jan 6;270(1):151-6.
118. Hurowitz EH, Melnyk JM, Chen YJ, Kouros-Mehr H, Simon MI, Shizuya H. Genomic characterization of the human heterotrimeric G protein alpha, beta, and gamma subunit genes. *DNA Res.* 2000 Apr 28;7(2):111-20.

119. Ikeda K, Kobayashi T, Ichikawa T, Usui H, Kumanishi T. Functional couplings of the delta- and the kappa-opioid receptors with the G-protein-activated K<sup>+</sup> channel. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995 Mar 8;208(1):302-8.
120. Ikeda SR. Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein betagamma subunits. *Nature*. 1996 Mar 21;380(6571):255-8.
121. Ikezu T, Trapp BD, Song KS, Schlegel A, Lisanti MP, Okamoto T. Caveolae, plasma membrane microdomains for alpha-secretase-mediated processing of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem*. 1998 Apr 24;273(17):10485-95.
- 1220 Ikezu T, Ueda H, Trapp BD, Nishiyama K, Sha JF, Volonte D, Galbiati F, Byrd AL, Bassell G, Serizawa H, Lane WS, Lisanti MP, Okamoto T. Affinity-purification and characterization of caveolins from the brain: differential expression of caveolin-1, -2, and -3 in brain endothelial and astroglial cell types. *Brain Res*. 1998 Sep 7;804(2):177-92
- 1230 Inglese J, Freedman NJ, Koch WJ, Lefkowitz RJ. Structure and mechanism of the G protein-coupled receptor kinases. *J Biol Chem*. 1993 Nov 15;268(32):23735-8.
- 1240 Inglese J, Koch WJ, Caron MG, Lefkowitz RJ. Isoprenylation in regulation of signal transduction by G-protein-coupled receptor kinases. *Nature*. 1992 Sep 10;359(6391):147-50.
- 1250 Inglese J, Premont RT. Lipid modifications of G-protein-coupled receptor kinases. *Biochem Soc Trans*. 1996 Aug;24(3):714-7.
- 1260 Ito O, Kondo Y, Takahashi N, Omata K, Abe K. Role of calcium in insulin-stimulated NaC1 transport in medullary thick ascending limb. *Am J Physiol*. 1995 Aug;269(2 Pt 2):F236-41.
- 1270 Iyengar R. Molecular and functional diversity of mammalian Gs-stimulated adenylyl cyclases. *FASEB J*. 1993 Jun;7(9):768-75
- 1280 Jelsema CL, Axelrod J. Stimulation of phospholipase A2 activity in bovine rod outer segments by the beta gamma subunits of transducin and its inhibition by the alpha subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Jun;84(11):3623-7.
- 1290 Jones DT, Reed RR. Molecular cloning of five GTP-binding protein cDNA species from rat olfactory neuroepithelium. *J Biol Chem*. 1987 Oct 15;262(29):14241-9.
- 1300 Katada T, Oinuma M, Kusakabe K, Ui M. A new GTP-binding protein in brain tissues serving as the specific substrate of islet-activating protein, pertussis toxin. *FEBS Lett*. 1987 Mar 23;213(2):353-8.

- 1310 Katz A, Simon MI. A segment of the C-terminal half of the G-protein beta 1 subunit specifies its interaction with the gamma 1 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Mar 14;92(6):1998-2002.
- 1320 Katz A, Wu D, Simon MI. Subunits beta gamma of heterotrimeric G protein activate beta 2 isoform of phospholipase C. *Nature*. 1992 Dec 17;360(6405):686-
- 1330 Keller P, Simons K. Cholesterol is required for surface transport of influenza virus hemagglutinin. Rothberg KG, Ying YS, Kamen BA, Anderson RG. Cholesterol controls the clustering of the glycopospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate. *J Cell Biol*. 1990 Dec;111(6 Pt 2):2931-8.
- 1340 Kelley WS. Therapeutic peptides: the devil is in the details. *Biotechnology (N Y)*. 1996 Jan;14(1):28-31
- 1350 Kenakin T, Morgan P, Lutz M. On the importance of the "antagonist assumption" to how receptors express themselves. *Biochem Pharmacol*. 1995 Jun 29;50(1):17-26.
- 1360 Kenakin T. Agonist-receptor efficacy. I: Mechanisms of efficacy and receptor promiscuity. *Trends Pharmacol Sci*. 1995 Jun;16(6):188-92.
- 1370 Kenakin T. Agonist-receptor efficacy. II. Agonist trafficking of receptor signals. *Trends Pharmacol Sci*. 1995 Jul;16(7):232-8.
- 1380 Kim D, Lewis DL, Graziadei L, Neer EJ, Bar-Sagi D, Clapham DE. G-protein beta gamma-subunits activate the cardiac muscarinic K<sup>+</sup>-channel via phospholipase A2. *Nature*. 1989 Feb 9;337(6207):557-60.
- 1390 Kim SY, Ang SL, Bloch DB, Bloch KD, Kawahara Y, Tolman C, Lee R, Seidman JG, Neer EJ. Identification of cDNA encoding an additional alpha subunit of a human GTP-binding protein: expression of three alpha i subtypes in human tissues and cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Jun;85(12):4153-7.
- 1400 Kleuss C, Gilman AG. G $\alpha$  contains an unidentified covalent modification that increases its affinity for adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jun 10;94(12):6116-20.
- 1410 Kleuss C, Scherubl H, Hescheler J, Schultz G, Wittig B. Different beta-subunits determine G-protein interaction with transmembrane receptors. *Nature*. 1992 Jul 30;358(6385):424-6.
- 1420 Kleuss C, Scherubl H, Hescheler J, Schultz G, Wittig B. Selectivity in signal transduction determined by gamma subunits of heterotrimeric G proteins. *Science*. 1993 Feb 5;259(5096):832-4.

- 1430 Kobayashi I, Shibasaki H, Takahashi K, Tohyama K, Kurachi Y, Ito H, Ui M, Katada T. Purification and characterization of five different alpha subunits of guanine-nucleotide-binding proteins in bovine brain membranes. Their physiological properties concerning the activities of adenylate cyclase and atrial muscarinic K<sup>+</sup> channels. *Eur J Biochem.* 1990 Jul 31;191(2):499-506
- 1440 Koch WJ, Inglese J, Stone WC, Lefkowitz RJ. The binding site for the beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins on the beta-adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem.* 1993 Apr 15;268(11):8256-60.
- 1450 Kong H, Raynor K, Yasuda K, Bell GI, Reisine T. Mutation of an aspartate at residue 89 in somatostatin receptor subtype 2 prevents Na<sup>+</sup> regulation of agonist binding but does not alter receptor-G protein association. *Mol Pharmacol.* 1993 Aug;44(2):380-4.
- 1460 Kozasa T, Gilman AG. Protein kinase C phosphorylates G12 alpha and inhibits its interaction with G beta gamma. *J Biol Chem.* 1996 May 24;271(21):12562-7.
- 1470 Kurose H, Katada T, Haga T, Haga K, Ichiyama A, Ui M. Functional interaction of purified muscarinic receptors with purified inhibitory guanine nucleotide regulatory proteins reconstituted in phospholipid vesicles. *J Biol Chem.* 1986 May 15;261(14):6423-8.
- 1480 Lai MH, Bard M, Kirsch DR. Identification of a gene encoding a new Ypt/Rab-like monomeric G-protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 1994 Mar;10(3):399-402.
- 1490 Lambright DG, Noel JP, Hamm HE, Sigler PB. Structural determinants for activation of the alpha-subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature.* 1994 Jun 23;369(6482):621-8.
- 1500 Lambright DG, Sondek J, Bohm A, Skiba NP, Hamm HE, Sigler PB. The 2.0 A crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature.* 1996 Jan 25;379(6563):311-9.
- 1510 Largent BL, Jones DT, Reed RR, Pearson RC, Snyder SH. G protein mRNA mapped in rat brain by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Apr;85(8):2864-8.
- 1520 Laugwitz KL, Offermanns S, Spicher K, Schultz G. Mu and delta opioid receptors differentially couple to G protein subtypes in membranes of human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neuron.* 1993 Feb;10(2):233-42.

- 1530 Leberer E, Dignard D, Hougan L, Thomas DY, Whiteway M. Dominant-negative mutants of a yeast G-protein beta subunit identify two functional regions involved in pheromone signalling. *EMBO J*. 1992 Dec;11(13):4805-13.
- 1540 Lee CH, Park D, Wu D, Rhee SG, Simon MI. Members of the Gq alpha subunit gene family activate phospholipase C beta isozymes. *J Biol Chem*. 1992 Aug 15;267(23):16044-7.
- 1550 Lee JH, Lee SK, Yang MH, Ahmed MM, Mohiuddin M, Lee EY. Expression and mutation of H-ras in uterine cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 1996 Jul;62(1):49-54.
- 1560 Lee RH, Lieberman BS, Yamane HK, Bok D, Fung BK. A third form of the G protein beta subunit. 1. Immunochemical identification and localization to cone photoreceptors. *J Biol Chem*. 1992 Dec 5;267(34):24776-81.
- 1570 Lee RH, Ting TD, Lieberman BS, Tobias DE, Lolley RN, Ho YK. Regulation of retinal cGMP cascade by phosducin in bovine rod photoreceptor cells. Interaction of phosducin and transducin. *J Biol Chem*. 1992 Dec 15;267(35):25104-12.
- 1580 Lee SB, Rao AK, Lee KH, Yang X, Bae YS, Rhee SG. Decreased expression of phospholipase C-beta 2 isozyme in human platelets with impaired function. *Blood*. 1996 Sep 1;88(5):1684-9
- 1590 Lefkowitz RJ, Inglese J, Koch WJ, Pitcher J, Attramadal H, Caron MG. G-protein-coupled receptors: regulatory role of receptor kinases and arrestin proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1992;57:127-33.
- 1600 Li S, Couet J, Lisanti MP. Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J Biol Chem*. 1996 Nov 15;271(46):29182-90.
- 1610 Li S, Couet J, Lisanti MP. Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J Biol Chem*. 1996 Nov 15;271(46):29182-90.
- 1620 Li S, Okamoto T, Chun M, Sargiacomo M, Casanova JE, Hansen SH, Nishimoto I, Lisanti MP. Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. *J Biol Chem*. 1995 Jun 30;270(26):15693-701.

- 1630 Li S, Seitz R, Lisanti MP. Phosphorylation of caveolin by src tyrosine kinases. The alpha-isoform of caveolin is selectively phosphorylated by v-Src in vivo. *J Biol Chem.* 1996 Feb 16;271(7):3863-8.
- 1640 Li S, Song KS, Lisanti MP. Expression and characterization of recombinant caveolin. Purification by polyhistidine tagging and cholesterol-dependent incorporation into defined lipid membranes. *J Biol Chem.* 1996 Jan 5;271(1):568-73.
- 1650 Li Y, Sternweis PM, Charnecki S, Smith TF, Gilman AG, Neer EJ, Kozasa T. Sites for G $\alpha$  binding on the G protein beta subunit overlap with sites for regulation of phospholipase C $\beta$  and adenylyl cyclase. *J Biol Chem.* 1998 Jun 26;273(26):16265-72.
- 1660 Lisanti MP, Scherer PE, Vidugiriene J, Tang Z, Hermanowski-Vosatka A, Tu YH, Cook RF, Sargiacomo M. Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol.* 1994 Jul;126(1):111-26.
- 1670 Lisanti MP, Scherer PE, Vidugiriene J, Tang Z, Hermanowski-Vosatka A, Tu YH, Cook RF, Sargiacomo M. Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol.* 1994 Jul;126(1):111-26.
- 1680 Lisanti MP, Tang Z, Scherer PE, Kubler E, Koleske AJ, Sargiacomo M. Caveolae, transmembrane signalling and cellular transformation. *Mol Membr Biol.* 1995 Jan-Mar;12(1):121-4.
- 1690 Lisanti MP, Tang Z, Scherer PE, Sargiacomo M. Caveolae purification and glycosylphosphatidylinositol-linked protein sorting in polarized epithelia., *Methods Enzymol.* 1995;250:655-68.
- 1700 Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J, Neer EJ, Clapham DE. The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K<sup>+</sup> channel in heart. *Nature.* 1987 Jan 22-28;325(6102):321-6.
- 1710 Lui PW, Fu MJ, Lin TC, Lee TY, Chan SH. Involvement of G(o) alpha subtype of guanine nucleotide-binding regulatory protein at the locus coeruleus in fentanyl-induced muscular rigidity in the rat. *Neurosci Lett.* 1994 Jan 3;165(1-2):199-202.
- 1720 Mangoura D, Sogos V, Dawson G. Related Articles Protein kinase C-epsilon is a developmentally regulated, neuronal isoform in the chick embryo central nervous system. *J Neurosci Res.* 1993 Aug 1;35(5):488-98.

- 1730 Manji HK, Chen G, Shimon H, Hsiao JK, Potter WZ, Belmaker RH. Guanine nucleotide-binding proteins in bipolar affective disorder. Effects of long-term lithium treatment. *Arch Gen Psychiatry*. 1995 Feb;52(2):135-44.
- 1740 Markby DW, Onrust R, Bourne HR. Separate GTP binding and GTPase activating domains of a G alpha subunit. *Science*. 1993 Dec 17;262(5141):1895-901.
- 1750 Martinez-Pena Y, Sanchez-Blazquez P, Garzon J. G-receptor antagonists increased the activating effect of mastoparan on low Km GTPase of mouse PAG. *Cell Signal*. 1995 Feb;7(2):151-5.
- 1760 Masters SB, Sullivan KA, Miller RT, Beiderman B, Lopez NG, Ramachandran J, Bourne HR. Carboxyl terminal domain of Gs alpha specifies coupling of receptors to stimulation of adenylyl cyclase. *Science*. 1988 Jul 22;241(4864):448-51.
- 1770 Matsuoka M, Itoh H, Kozasa T, Kaziro Y. Sequence analysis of cDNA and genomic DNA for a putative pertussis toxin-insensitive guanine nucleotide-binding regulatory protein alpha subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Aug;85(15):5384-8.
- 1780 Mattera R, Graziano MP, Yatani A, Zhou Z, Graf R, Codina J, Birnbaumer L, Gilman AG, Brown AM. Splice variants of the alpha subunit of the G protein Gs activate both adenylyl cyclase and calcium channels. *Science*. 1989 Feb 10;243(4892):804-7.
- 1790 Mattera R, Yatani A, Kirsch GE, Graf R, Okabe K, Olate J, Codina J, Brown AM, Birnbaumer L.
- 1800 McCarthy KD, de Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol*. 1980 Jun;85(3):890-902.
- 1810 Miller WE, Maudsley S, Ahn S, Khan KD, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. beta-arrestin1 interacts with the catalytic domain of the tyrosine kinase c-SRC. Role of beta-arrestin1-dependent targeting of c-SRC in receptor endocytosis. *J Biol Chem*. 2000 Apr 14;275(15):11312-9.
- 1820 Milligan G, Gierschik P, Spiegel AM, Klee WA. The GTP-binding regulatory proteins of neuroblastoma x glioma, NG108-15, and glioma, C6, cells. Immunochemical evidence of a pertussis toxin substrate that is neither Ni nor No. *FEBS Lett*. 1986 Jan 20;195(1-2):225-30.
- 1830 Milligan G, Grassie MA, Wise A, MacEwan DJ, Magee AI, Parenti M. G-protein palmitoylation: regulation and functional significance. *Biochem Soc Trans*. 1995 Aug;23(3):583-7.

- 1840 Milligan G, Mullaney I, McCallum JF. Distribution and relative levels of expression of the phosphoinositidase-C-linked G-proteins Gq alpha and G11 alpha: absence of G11 alpha in human platelets and haemopoietically derived cell lines. *Biochim Biophys Acta*. 1993 Nov 7;1179(2):208-12.
- 1850 Milligan G, Mullaney I, McCallum JF. Distribution and relative levels of expression of the phosphoinositidase-C-linked G-proteins Gq alpha and G11 alpha: absence of G11 alpha in human platelets and haemopoietically derived cell lines. *Biochim Biophys Acta*. 1993 Nov 7;1179(2):208-12.
- 1860 Milligan G, Simonds WF, Streaty RA, Tocque B, Klee WA. Functional control of the delta-opiate receptor by the inhibitory guanine nucleotide-binding protein. *Biochem Soc Trans*. 1985 Dec;13(6):1110-3.
- 1870 Milligan G. Agonist regulation of cellular G protein levels and distribution: mechanisms and functional implications. *Trends Pharmacol Sci*. 1993 Nov;14(11):413-
- 1880 Milligan G. Mechanisms of multifunctional signalling by G protein-linked receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 1993 Jun;14(6):239-44.
- 1890 Mixon MB, Lee E, Coleman DE, Berghuis AM, Gilman AG, Sprang SR. Tertiary and quaternary structural changes in Gi alpha 1 induced by GTP hydrolysis. *Science*. 1995 Nov 10;270(5238):954-60.
- 1900 Miyamae T, Fukushima N, Misu Y, Ueda H. Delta opioid receptor mediates phospholipase C activation via Gi in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett*. 1993 Nov 1;333(3):311-4.
- 1910 Moffett S, Brown DA, Linder ME. Lipid-dependent targeting of G proteins into rafts. *J Biol Chem*. 2000 Jan 21;275(3):2191
- 1920 Moises HC, Rusin KI, Macdonald RL. Mu- and kappa-opioid receptors selectively reduce the same transient components of high-threshold calcium current in rat dorsal root ganglion sensory neurons. *J Neurosci*. 1994 Oct;14(10):5903-16.
- 1930 Moises HC, Rusin KI, Macdonald RL. Mu-Opioid receptor-mediated reduction of neuronal calcium current occurs via a J *Neurosci*. 1994 Jun;14(6):3842-51.
- 1940 Monier S, Parton RG, Vogel F, Behlke J, Henske A, Kurzchalia TV. VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell*. 1995 Jul;6(7):911-27.
- 1950 Mons N, Cooper DM. Adenylate cyclases: critical foci in neuronal signaling. *Trends Neurosci*. 1995 Dec;18(12):536-42.



- 1960 Morikawa H, Fukuda K, Kato S, Mori K, Higashida H. Coupling of the cloned mu-opioid receptor with the omega-conotoxin-sensitive Ca<sup>2+</sup> current in NG108-15 cells. *J Neurochem.* 1995 Sep;65(3):1403-6.
- 1970 Morikawa Y. Further lowering of work function by oxygen adsorption on the K/Si(001) surface. *Phys Rev B Condens Matter.* 1995 May 15;51(20):14802-14805.
- 1980 Morishita R, Nakayama H, Isobe T, Matsuda T, Hashimoto Y, Okano T, Fukada Y, Mizuno K, Ohno S, Kozawa O. Primary structure of a gamma subunit of G protein, gamma 12, and its phosphorylation by protein kinase C. *J Biol Chem.* 1995 Dec 8;270(49):29469-75.
- 1990 Morris AJ, Rudge SA, Mahlum CE, Jenco JM. Regulation of phosphoinositide-3-kinase by G protein beta gamma subunits in a rat osteosarcoma cell line. *Mol Pharmacol.* 1995 Sep;48(3):532-9.
- 2000 Mousli M, Bueb JL, Bronner C, Rouot B, Landry Y. G protein activation: a receptor-independent mode of action for cationic amphiphilic neuropeptides and venom peptides. *Trends Pharmacol Sci.* 1990 Sep;11(9):358-62.
- 2010 Moxham CM, Hod Y, Malbon CC. Induction of G alpha i2-specific antisense RNA in vivo inhibits neonatal growth. *Science.* 1993 May 14;260(5110):991-5.
- 2020 Muller S, Straub A, Schroder S, Bauer PH, Lohse MJ. Interactions of phosducin with defined G protein beta gamma-subunits. *J Biol Chem.* 1996 May 17;271(20):11781-6.
- 2030 Mumby SM, Kleuss C, Gilman AG. Receptor regulation of G-protein palmitoylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Mar 29;91(7):2800-4.
- 2040 Murayama T, Matsuoka Y, Takahashi A, Asano T, Kato K. [Concentration of the alpha subunit of GTP-binding protein G<sub>0</sub> in the cerebrospinal fluid of patients with neurological disorders]. *Rinsho Shinkeigaku.* 1988 May;28(5):525-31
- 2050 Murayama T, Takahashi A, Asano T, Kato K. fluid of patients with neurological disorders. *J Mol Neurosci.* 1989;1(1):27-32. Carter BD, Medzihradsky F. Go mediates the coupling of the mu opioid receptor to adenylyl cyclase in cloned neural cells and brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 May 1;90(9):4062-6.
- 2060 Murray-Whelan R, Schlegel W. Brain somatostatin receptor-G protein interaction. G alpha C-terminal antibodies demonstrate coupling of the soluble receptor with Gi(1-3) but not with Go. *J Biol Chem.* 1992 Feb 15;267(5):2960-5.

- 2070 Narita M, Yajima Y, Suzuki T. [A new turn of research for morphine dependence]. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi*. 2000 Oct;35(5):283-94.
- 2080 Neer EJ, Clapham DE. Roles of G protein subunits in transmembrane signalling. *Nature*. 1988 May 12;333(6169):129-34.
- 2090 Neer EJ, Kim SY, Ang SL, Bloch DB, Bloch KD, Kawahara Y, Tolman C, Lee R, Logothetis D, Kim D. Functions of G-protein subunits. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1988;53 Pt 1:241-6.
- 2100 Neer EJ, Lok JM, Wolf LG. Purification and properties of the inhibitory guanine nucleotide regulatory unit of brain adenylate cyclase. *J Biol Chem*. 1984 Nov 25;259(22):14222-9.
- 2110 Neer EJ, Smith TF. G protein heterodimers: new structures propel new questions. *Cell*. 1996 Jan 26;84(2):175-8.
- 2120 Neer EJ. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell*. 1995 Jan 27;80(2):249-57.
- 2130 Neer EJ. G proteins: critical control points for transmembrane signals. *Protein Sci*. 1994 Jan;3(1):3-14.
- 2140 Nishimoto I, Okamoto T, Matsuura Y, Takahashi S, Okamoto T, Murayama Y, Ogata E. Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding G(o) *Nature*. 1993 Mar 4;362(6415):75-9.
- 2150 Nishino N, Kitamura N, Hashimoto T, Kajimoto Y, Shirai Y, Murakami N, Nakai T, Komure O, Shirakawa O, Mita T, et al. Increase in [3H]cAMP binding sites and decrease in Gi alpha and Go alpha immunoreactivities in left temporal cortices from patients with schizophrenia. *Brain Res*. 1993 Jun 25;615(1):41-49.
- 2160 Offerman JD. Computer-assisted selection of oligonucleotides and determination of critical parameters. For their use in molecular biology. *Am Biotechnol Lab*. 1994 Jul;10(7):15-6.
- 2170 Okamoto CT. Endocytosis and transcytosis. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998 Feb 2;29(3):215-228.
- 2180 Orford M, Mazurkiewicz D, Milligan G, Saggerson D. Abundance of the alpha-subunits of Gi1, Gi2 and Go in synaptosomal membranes from several regions of the rat brain is increased in hypothyroidism. *Biochem J*. 1991 Apr 1;275 ( Pt 1):183-6.

- 2190 Panegyres PK, Hughes J. Activation of c-fos mRNA in the brain by the kappa-opioid receptor agonist enadoline and the NMDA receptor antagonist dizocilpine. *Eur J Pharmacol.* 1997 Jun 5;328(1):31-6.
- 2200 Parton RG. Caveolae and caveolins. *Curr Opin Cell Biol.* 1996 Aug;8(4):25-29
- 2210 Peraldi S, Nguyen Than Dao B, Brabet P, Homburger V, Rouot B, Toutant MBouille C, Assenmacher I, Bockaert J, Gabrion J. Apical localization of the alpha subunit of GTP-binding protein Go in choroidal and ciliated ependymocytes. *J Neurosci.* 1989 Mar;9(3):806-14.
- 2220 Pitcher JA, Inglese J, Higgins JB, Arriza JL, Casey PJ, Kim C, Benovic JL, Kwatra MM, Caron MG, Lefkowitz RJ. Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors. *Science.* 1992 Aug 28;257(5074):1264-7.
- 2230 Ponimaskin E, Behn H, Adarichev V, Voyno-Yasenetskay TA, Offermanns S, Schmidt MF. Acylation of Galpha(13) is important for its interaction with thrombin receptor, transforming activity and actin stress fiber formation. *FEBS Lett.* 2000 Jul 28;478(1-2):173-7.
- 2240 Premont RT, Matsuoka I, Mattei MG, Pouille Y, Defer N, Hanoune J. Identification and characterization of a widely expressed form of adenylyl cyclase. *J Biol Chem.* 1996 Jun 7;271(23):13900-7
- 2250 Pulvermuller A, Schroder K, Fischer T, Hofmann KP. Interactions of metarhodopsin II. Arrestin peptides compete with arrestin and transducin. *J Biol Chem.* 2000 Dec 1;275(48):37679-85.
- 2260 Raffa RB, Martinez RP, Connelly CD. G-protein antisense oligodeoxyribonucleotides and mu-opioid supraspinal antinociception. *Eur J Pharmacol.* 1994 Jun 2;258(1-2):R5-7.
- 2270 Rarick HM, Artemyev NO, Hamm HE. A site on rod G protein alpha subunit that mediates effector activation. *Science.* 1992 May 15;256(5059):1031-3.
- 2280 Rasenick MM, Chaney KA, Chen J. G protein-mediated signal transduction as a target of antidepressant and antibipolar drug action: evidence from model systems *J Clin Psychiatry.* 1996;57 Suppl 13:49-55; discussion 56-8.
- 2290 Recombinant alpha i-3 subunit of G protein activates Gk-gated K<sup>+</sup> channels. *J Biol Chem.* 1989 Jan 5;264(1):465-71.

- 2300 Rens-Domiano S, Hamm HE. Structural and functional relationships of heterotrimeric G-proteins. *FASEB J*. 1995 Aug;9(11):1059-66.
- 2310 Resh MD. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Aug 12;1451(1):1-16.
- 2320 Resh MD. Myristylation and palmitoylation of Src family members: the fats of the matter. *Cell*. 1994 Feb 11;76(3):411-18
- 2330 Reuveny E, Slesinger PA, Inglese J, Morales JM, Iniguez-Lluhi JA, Lefkowitz RJ, Bourne HR, Jan YN, Jan LY. Activation of the cloned muscarinic potassium channel by G protein beta gamma subunits. *Nature*. 1994 Jul 14;370(6485):143-6.
- 2340 Robillard L, Ethier N, Lachance M, Hebert TE. Gbetagamma subunit combinations differentially modulate receptor and effector coupling in vivo. *Cell Signal*. 2000 Oct 1;12(9-10):673-682.
- 2350 Rodbell M, Krans HM, Pohl SL, Birnbaumer L. The glucagon-sensitive adenyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. IV. Effects of guanylnucleotides on binding of 125I-glucagon. *J Biol Chem*. 1971 Mar 25;246(6):1872-6.
- 2360 Roerig SC, Lei S, Kitto K, Hylden JK, Wilcox GL. Spinal interactions between opioid and noradrenergic agonists in mice: multiplicativity involves delta and alpha-2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992 Jul;262(1):365-74.
- 2370 Ross EM, Posner BA, Mukhopadhyay S, Tesmer JJ, Gilman AG. Modulation of the affinity and selectivity of RGS protein interaction with G alpha subunits by a conserved asparagine/serine residue. *Biochemistry*. 1999 Jun 15;38(24):7773-9.
- 2380 Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*. 1992 Feb 21;68(4):673-82.
- 2390 Sánchez-Blázquez P, Garcia-Espana A, Garzón J. In vivo injection of antisense oligodeoxynucleotides to G alpha subunits and supraspinal analgesia evoked by mu and delta opioid agonists. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995 Dec;275(3):1590-6.
- 2400 Sánchez-Blázquez P, Garzón J. Antibodies directed against alpha subunits of Gi, Gx/z, GO and GS transducer proteins reduced the morphine withdrawal syndrome in mice. *Life Sci*. 1994;55(23)
- 2410 Sánchez-Blázquez P, Garzón J. Cholera toxin and pertussis toxin on opioid- and alpha 2-mediated supraspinal analgesia in mice. *Life Sci*. 1991;48(18):1721-7.

- 2420 Sánchez-Blázquez P, Garzón J. Delta Opioid receptor subtypes activate inositol-signaling pathways in the production of antinociception. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998 May;285(2):820-7.
- 2430 Sánchez-Blázquez P, Garzón J. Delta-opioid supraspinal antinociception in mice is mediated by Gi3 transducer proteins. *Life Sci*. 1993;53(7):PL129-34.
- 2440 Sánchez-Blázquez P, Garzón J. Further characterization of alpha N-acetyl beta-endorphin-(1-31) regulatory activity, I: Effect on opioid- and alpha 2-mediated supraspinal antinociception in mice. *Life Sci*. 1992;50(26):2083-97.
- 2450 Sánchez-Blázquez P, Garzón J. Intracerebroventricular injection of antibodies directed against Gs alpha enhances the supraspinal antinociception induced by morphine, beta-endorphin and clonidine in mice. *Life Sci*. 1992;51(24):PL237-42. 20:
- 2460 Sánchez-Blázquez P, Garzón J. Mastoparan reduces the supraspinal analgesia mediated by mu/delta-opioid receptors in mice. *Eur J Pharmacol*. 1994 Jun 2;258(1-2):159-62.
- 2470 Sánchez-Blázquez P, Juarros JL, Martínez-Peña Y, Castro MA, Garzón J. Gx/z and Gi2 transducer proteins on mu/delta opioid-mediated supraspinal antinociception. *Life Sci*. 1993;53(23)
- 2480 Sánchez-Blázquez P, Rodríguez-Díaz M, DeAntonio I, Garzón J. Endomorphin-1 and endomorphin-2 show differences in their activation of mu opioid receptor-regulated G proteins in supraspinal antinociception in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999 Oct;291(1):12-8.
- 2490 Sánchez-Blázquez P, Rodríguez-Díaz M, DeAntonio I, Garzón J. Endomorphin-1 and endomorphin-2 show differences in their activation of mu opioid receptor-regulated G proteins in supraspinal antinociception in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999 Oct;291(1):12-8.
- 2500 Sargiacomo M, Scherer PE, Tang Z, Kubler E, Song KS, Sanders MC, Lisanti MP. Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Sep 26;92(20):9407-11.
- 2510 Sargiacomo M, Scherer PE, Tang ZL, Casanova JE, Lisanti MP. In vitro phosphorylation of caveolin-rich membrane domains: identification of an associated serine kinase activity as a casein kinase II-like enzyme. *Oncogene*. 1994 Sep;9(9):2589-95. PMID: 8058322

- 2520 Scheer A, Gierschik P. S-prenylated cysteine analogues inhibit receptor-mediated G protein activation in native human granulocyte and reconstituted bovine retinal rod outer segment membranes. *Biochemistry*. 1995 Apr 18;34(15):4952-61.
- 2530 Scherer PE, Lewis RY, Volonte D, Engelman JA, Galbiati F, Couet J, Kohtz DS, van Donselaar E, Peters P, Lisanti MP. Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J Biol Chem*. 1997 Nov 14;272(46):29337-46.
- 2540 Scherer PE, Lewis RY, Volonte D, Engelman JA, Galbiati F, Couet J, Kohtz DS, van Donselaar E, Peters P, Lisanti MP. Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J Biol Chem*. 1997 Nov 14;272(46):29337-46.
- 2550 Scherer PE, Lisanti MP, Baldini G, Sargiacomo M, Mastick CC, Lodish HF. Induction of caveolin during adipogenesis and association of GLUT4 with caveolin-rich vesicles. *J Cell Biol*. 1994 Dec;127(5):1233-43.
- 2560 Scherer PE, Lisanti MP. Association of phosphofructokinase-M with caveolin-3 in differentiated skeletal myotubes. Dynamic regulation by extracellular glucose and intracellular metabolites. *J Biol Chem*. 1997 Aug 15;272(33):20698-705.
- 2570 Scherer PE, Okamoto T, Chun M, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP. Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jan 9;93(1):131-5.
- 2580 Scherer PE, Okamoto T, Chun M, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP. Related Articles, Protein, Nucleotide, OMIM. Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jan 9;93(1):131-5.
259. Scherer PE, Tang Z, Chun M, Sargiacomo M, Lodish HF, Lisanti MP. Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution. Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe. *J Biol Chem*. 1995 Jul 7;270(27):16395-401.
260. Schmidt A, Hall MN. Signaling to the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1998;14:305-38.
261. Schulz K, Danner S, Bauer P, Schroder S, Lohse MJ. Expression of phosducin in a phosducin-negative cell line reveals functions of a Gbetagamma-binding protein. *J Biol Chem*. 1996 Sep 13;271(37):22546-51.

262. Schwab ME, Thoenen H. Retrograde axonal and transsynaptic transport of macromolecules: physiological and pathophysiological importance. *Agents Actions*. 1977 Sep;7(3):361-8
263. Sharma RK, McLaughlin CA, Pitot HC. Cyclin nucleotide binding sites of the smooth endoplasmic reticulum from normal and neoplastic liver in the rat. *Cancer Lett*. 1975 Nov;1(2):61-7.
264. Shen J, Shah S, Hsu H, Yoburn BC. The effects of antisense to G $\alpha$ 2 on opioid agonist potency and G $\alpha$ 2 protein and mRNA abundance in the mouse. *Brain Res Mol Brain Res*. 1998 Aug 31;59(2):247-55.
265. Shenoy-Scaria AM, Dietzen DJ, Kwong J, Link DC, Lublin DM. Cysteine3 of Src family protein tyrosine kinase determines palmitoylation and localization in caveolae. *J Cell Biol*. 1994 Jul;126(2):353-63.
266. Sim LJ, Selley DE, Xiao R, Childers SR. Differences in G-protein activation by mu- and delta-opioid, and cannabinoid, receptors in rat striatum. *Eur J Pharmacol*. 1996 Jun 20;307(1):97-105.
267. Simonds WF, Collins RM, Spiegel AM, Brann MR. Membrane attachment of recombinant G-protein alpha-subunits in excess of beta gamma subunits in a eukaryotic expression system. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989 Oct 16;164(1):46-53.
268. Smart D, Smith G, Lambert DG. mu-Opioid receptor stimulation of inositol (1,4,5)trisphosphate formation via a pertussis toxin-sensitive G protein. *J Neurochem*. 1994 Mar;62(3):1009-14
269. Smart JL, McCammon JA. Analysis of synaptic transmission in the neuromuscular junction using a continuum finite element model. *Biophys J*. 1998 Oct;75(4):1679-88.
270. Smrcka AV, Sternweis PC. Regulation of purified subtypes of phosphatidylinositol-specific phospholipase C beta by G protein alpha and beta gamma subunits. *J Biol Chem*. 1993 May 5;268(13):9667-74.
271. Snow BE, Antonio L, Suggs S, Siderovski DP. Cloning of a retinally abundant regulator of G-protein signaling (RGS-r/RGS16): genomic structure and chromosomal localization of the human gene. *Gene*. 1998 Jan 12;206(2):247-53.
272. Sondek J, Bohm A, Lambright DG, Hamm HE, Sigler PB. Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1 Å resolution. *Nature*. 1996 Jan 25;379(6563):369-74.

273. Sondek J, Lambright DG, Noel JP, Hamm HE, Sigler PB. GTPase mechanism of Gproteins from the 1.7-A crystal structure of transducinalpha-GDP-AIF-4. *Nature*. 1994 Nov 17;372(6503):276-9.
274. Song J, Hirschman J, Gunn K, Dohlman HG. Regulation of membrane and subunit interactions by N-myristoylation of a G protein alpha subunit in yeast. *J Biol Chem*. 1996 Aug 23;271(34):20273-83.
275. Song KS, Sargiacomo M, Galbiati F, Parenti M, Lisanti MP. Targeting of a G alpha subunit (Gi1 alpha) and c-Src tyrosine kinase to caveolae membranes: clarifying the role of N-myristoylation. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 1997 May;43(3):293-303.
276. Song KS, Scherer PE, Tang Z, Okamoto T, Li S, Chafel M, Chu C, Kohtz DS, Lisanti MP. Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin an dystrophin-associated glycoproteins. *J Biol Chem*. 1996 Jun 21;271(25):15160-5.
277. Song KS, Tang Z, Li S, Lisanti MP. Mutational analysis of the properties of caveolin-1. A novel role for the C-terminal domain in mediating homo-typic caveolin-caveolin interactions. *J Biol Chem*. 1997 Feb 14;272(7):4398-403.
278. Standifer KM, Chien CC, Wahlestedt C, Brown GP, Pasternak GW. Selective loss of delta opioid analgesia and binding by antisense oligodeoxynucleotides to a delta opioid receptor. *Neuron*. 1994 Apr;12(4):805-10.
279. Standifer KM, Rossi GC, Pasternak GW. Differential blockade of opioid analgesia by antisense oligodeoxynucleotides directed against various G protein alpha subunits. *Mol Pharmacol*. 1996 Aug;50(2):293-8.
280. Standifer KM, Rossi GC, Pasternak GW. Differential blockade of opioid analgesia by antisense oligodeoxynucleotides directed against various G protein alpha subunits. *Mol Pharmacol*. 1996 Aug;50(2):293-8.
281. Stehno-Bittel L, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Perez-Terzic C, Clapham DE. The G protein beta gamma subunit transduces the muscarinic receptor signal for Ca<sup>2+</sup> release in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem*. 1995 Dec 15;270(50):30068
282. Stein B, Mende U, Neumann J, Schmitz W, Scholz H. Pertussis toxin unmasks stimulatory myocardial A2-adenosine receptors on ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 1993 Jun;25(6):655-9.



283. Sternweis PC, Northup JK, Smigel MD, Gilman AG. The regulatory component of adenylate cyclase. Purification and properties. *J Biol Chem.* 1981 Nov 25;256(22):11517-26.
284. Sternweis PC, Robishaw JD. Isolation of two proteins with high affinity for guanine nucleotides from membranes of bovine brain. *J Biol Chem.* 1984 Nov 25;259(22):13806-13.
285. Sternweis PC, Smrcka AV. Regulation of phospholipase C by G proteins. *Trends Biochem Sci.* 1992 Dec;17(12):502-6
286. Strosberg MA. Intensive care units in the triage mode: an organizational perspective. *Hosp Health Serv Adm.* 1991 Spring;36(1):95-109.
287. Stryer L, Bourne HR. G proteins: a family of signal transducers. *Annu Rev Cell Biol.* 1986;2:391-419.
288. Stryer L. Rapid motions in protein molecules. *Biochem Soc Symp.* 1981;(46):39-55.
289. Suki WN, Abramowitz J, Mattera R, Codina J, Birnbaumer. The human genome encodes at least three non-allelic G proteins with alpha i-type subunits. *FEBS Lett.* 1987 Aug 10;220(1):187-92.
290. Takashi M, Takagi Y, Sakata T, Shimoji T, Miyake K. Surgical treatment of renal cell carcinoma metastases: prognostic significance. *Int Urol Nephrol.* 1995;27(1):1-8.
291. Tang WJ, Gilman AG. Adenylyl cyclases. *Cell.* 1992 Sep 18;70(6):869-7
292. Tang WJ, Gilman AG. Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein beta gamma subunits. *Science.* 1991 Dec 6;254(5037):1500-3.
293. Tang Z, Okamoto T, Boontrakulpoontawee P, Katada T, Otsuka AJ, Lisanti MP. Related Articles, Protein, Nucleotide Identification, sequence, and expression of an invertebrate caveolin gene family from the nematode *Caenorhabditis elegans*. Implications for the molecular evolution of mammalian caveolin genes. *J Biol Chem.* 1997 Jan 24;272(4):2437-45.
294. Teixeira A, Chaverot N, Schroder C, Strosberg AD, Couraud PO, Cazaubon S. Requirement of caveolae microdomains in extracellular signal-regulated kinase and focal adhesion kinase activation induced by endothelin-1 in primary astrocytes. *J Neurochem.* 1999 Jan;72(1):120-8.
295. Tesmer JJ, Sunahara RK, Gilman AG, Sprang SR. Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G $\alpha$ .GTP $\gamma$ S. *Science.* 1997 Dec 12;278(5345):1907-16.

296. Tokuyama S, Feng Y, Wakabayashi H, Ho IK. Possible involvement of protein kinases in physical dependence on opioids: studies using protein kinase inhibitors, H-7 and H-8. *Eur J Pharmacol.* 1995 Sep 15;284(1-2):101-7.
297. Touhara K,INGLESE J, Pitcher JA, Shaw G, Lefkowitz RJ. Binding of G protein beta gamma-subunits to pleckstrin homology domains. *J Biol Chem.* 1994 Apr 8;269(14):10217-20.
298. Tsu RC, Allen RA, Wong YH. Stimulation of type II adenylyl cyclase by chemoattractant formyl peptide and C5a receptors. *Mol Pharmacol.* 1995 Apr;47(4):835-41.
299. Tsu RC, Chan JS, Wong YH. Regulation of multiple effectors by the cloned delta-opioid receptor: stimulation of phospholipase C and type II adenylyl cyclase. *J Neurochem.* 1995 Jun;64(6):2700-7.
300. Tsu RC, Lai HW, Allen RA, Wong YH. Differential coupling of the formyl peptide receptor to adenylate cyclase and phospholipase C by the pertussis toxin-insensitive Gz protein. *Biochem J.* 1995 Jul 1;309 ( Pt 1):331-9.
301. Tsu RC, Lai HW, Allen RA, Wong YH. Differential coupling of the formyl peptide receptor to adenylate cyclase and phospholipase C by the pertussis toxin-insensitive Gz protein. *Biochem J.* 1995 Jul 1;309 ( Pt 1):331-9.
302. Ueda H, Harada H, Nozaki M, Katada T, Ui M, Satoh M, Takagi H. Reconstitution of rat brain mu opioid receptors with purified guanine nucleotide-binding regulatory proteins, Gi and Go. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Sep;85(18):7013-7.
303. Ueda H, Uno S, Harada J, Kobayashi I, Katada T, Ui M, Satoh M. Evidence for receptor-mediated inhibition of intrinsic activity of GTP-binding protein, Gi1 and Gi2, but not G0 in reconstitution experiments. *FEBS Lett.* 1990 Jun 18;266(1-2):178-82.
304. Ueda H. [Molecular pharmacology of opioid receptor mechanisms]. *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 1989 Dec;94(6):339-49.
305. Van Biesen T, Hawes BE, Luttrell DK, Krueger KM, Touhara K, Porfiri E, Sakaue M, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Receptor-tyrosine-kinase- and G beta gamma-mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. *Nature.* 1995 Aug 31;376(6543):781-4
306. Vishnivetskiy SA, Schubert C, Climaco GC, Gurevich YV, Velez MG, Gurevich VV. An additional phosphate-binding element in arrestin molecule. Implications for the mechanism of arrestin activation. *J Biol Chem.* 2000 Dec 29;275(52):41049-57.

307. Wall MA, Coleman DE, Lee E, Iniguez-Lluhi JA, Posner BA, Gilman AG, Sprang SR. The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2. *Cell*. 1995 Dec 15;83(6):1047-58.
308. Wall MA, Coleman DE, Lee E, Iniguez-Lluhi JA, Posner BA, Gilman AG, Sprang SR. The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2. *Cell*. 1995 Dec 15;83(6):1047-58.
309. Wang J, Ducret A, Tu Y, Kozasa T, Aebersold R, Ross EM. RGSZ1, a Gz-selective RGS protein in brain. Structure, membrane association, regulation by G $\alpha$ phaz phosphorylation, and relationship to a Gz gtpase-activating protein subfamily. *J Biol Chem*. 1998 Oct 2;273(40):26014-25.
310. Wang DL, Wung BS, Peng YC, Wang JJ. Mechanical strain increases endothelin-1 gene expression via protein kinase C pathway in human endothelial cells. *J Cell Physiol*. 1995 May;163(2):400-6.
311. Wehmeyer A, Schulz R. Overexpression of delta-opioid receptors in recombinant baculovirus-infected *Trichoplusia ni* "High 5" insect cells. *J Neurochem*. 1997 Apr;68(4):1361-71.
312. Wickman K, Clapham DE. Ion channel regulation by G proteins. *Physiol Rev*. 1995 Oct;75(4):865-85.
313. Wickman KD, Clapham DE. G-protein regulation of ion channels. *Curr Opin Neurobiol*. 1995 Jun;5(3):278-85.
314. Wickman KD, Iniguez-Lluhi JA, Davenport PA, Taussig R, Krapivinsky GB, Linder ME, Gilman AG, Clapham DE. Recombinant G-protein beta gamma-subunits activate the muscarinic-gated atrial potassium channel. *Nature*. 1994 Mar 17;368(6468):255-7.
315. Williams JT, Christie MJ, Manzoni O. Cellular and Synaptic Adaptations Mediating Opioid Dependence. *Physiol Rev*. 2001 Jan;81(1):299-343.
316. Wolozin BL, Pasternak GW. Classification of multiple morphine and enkephalin binding sites in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Oct;78(10):6181-5.
317. Yakubov LA, Deeva EA, Zarytova VF, Ivanova EM, Ryte AS, YurchenkoLV, Vlassov VV. Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: involvement of specific receptors? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Sep;86(17):6454-8.
318. Yamane HK, Fung BK. Covalent modifications of G-proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1993;33:201-41.

319. Yatani A, Codina J, Imoto Y, Reeves JP, Birnbaumer L, Brown AM. A G protein directly regulates mammalian cardiac calcium channels. *Science*. 1987 Nov 27;238(4831):1288-92.
320. Yatani A, Imoto Y, Codina J, Hamilton SL, Brown AM, Birnbaumer L. The stimulatory G protein of adenylyl cyclase, Gs, also stimulates dihydropyridine-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels. Evidence for direct regulation independent of phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase or stimulation by a dihydropyridine agonist.
321. Yatani A, Mattera R, Codina J, Graf R, Okabe K, Padrell E, Iyengar R, Brown AM, Birnbaumer L. The G protein-gated atrial K<sup>+</sup> channel is stimulated by three distinct Gi alpha-subunits. *Nature*. 1988 Dec 15;336(6200):680-2.
322. Young LT, Li PP, Kish SJ, Siu KP, Kamble A, Hornykiewicz O, Warsh JJ. Cerebral cortex Gs alpha protein levels and forskolin-stimulated cyclic AMP formation are increased in bipolar affective disorder. *J Neurochem*. 1993 Sep;61(3):89
323. Yu Y, Nair BG, Patel TB. Epidermal growth factor stimulates cAMP accumulation in cultured rat cardiac myocytes. *J Cell Physiol*. 1992 Mar;150(3):559-67.